

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

VANESSA BRITO DE SOUZA RABELLO

**IMPACTO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO NA
CARACTERIZAÇÃO POR TAXONOMIA POLIFÁSICA
DE ISOLADOS DE *Sporothrix* spp.**

Rio de Janeiro

2018

**IMPACTO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO NA
CARACTERIZAÇÃO POR TAXONOMIA POLIFÁSICA
DE ISOLADOS DE *Sporothrix* spp.**

VANESSA BRITO DE SOUZA RABELLO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof. Dr Manoel Marques Evangelista de Oliveira
Prof. Dra. Rosely Maria Zancopé-Oliveira

Rio de Janeiro

2018

Rabello, Vanessa Brito de Souza .

Impacto de métodos de preservação na caracterização por taxonomia polifásica de isolados de *sporothrix* spp. / Vanessa Brito de Souza Rabello. - Rio de Janeiro, 2018.
97 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2018.

Orientador: Manoel Marques Evangelista de Oliveira.

Co-orientadora: Rosely Maria Zancopé Oliveira .

Bibliografia: f. 80-97

1. Preservação. 2. *Sporothrix* spp.. 3. Fenótipo. 4. Genótipo. I. Título.

À minha família, aos meus pais Edelmo e Deise, às minhas irmãs Evelin e Débora, às minhas tias Graça e Nina e a minha avó Almerinda, pelo apoio, ensinamentos e dedicação e principalmente a minha mãe do coração Waldete, a quem devo todo amor, carinho, apoio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, depois a minha família por me apoiar e aconselhar sempre, por todo o envolvimento durante minha trajetória acadêmica. Aos meus pais, Deise e Edelmo, a minha mãe do coração Waldete, as minhas irmãs Evelin e Débora, a minha tia Graça.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira e a Prof^a. Dr^a. Rosely Maria Zancopé Oliveira, pela orientação e pela oportunidade de realizar esse e outros trabalhos, pelos ensinamentos e dedicação, pelo importante aprendizado profissional e pessoal, por mais que tenha sido árduo o caminho, sempre acreditei na superação.

À Prof^a. Dr^a. Gisela Lara da Costa do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), pelo acolhimento em seu laboratório durante etapas da execução desse trabalho e principal pelo carinho de sempre.

As Prof^a. Tatiana de Castro Abreu Pinto e Lucia Martins Teixeira da Universidade Federal do Rio de Janeiro, do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Goes, Departamento de Microbiologia Médica, pelo auxílio nesse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Manuela da Silva pelas ótimas contribuições realizadas durante os seminários.

Ao Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes pela revisão da dissertação, pelas sugestões e contribuições no trabalho.

À Fiocruz, ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas e aos seus professores.

Ao Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI / Fiocruz), a todos os colegas de trabalho, em especial Mauro Muniz, Cláudia Pizzini,

Marcos Almeida, Luã Cardoso, Fernando da Silva, Leonardo Barbedo, Lucas Machado Moreira, Rowena Alves Coelho, Maria Helena Galdino, Rodrigo de Almeida Paes, Fabio Brito dos Santos, pela ótima receptividade e por todo apoio e incentivo.

À Jéssica Sepulveda Boechat pelo acompanhamento inicial quando eu era aluna de iniciação científica contribuindo para meu aprendizado e realização do trabalho.

As alunas Stefani Favorette de Aguiar e Anna Carolina Procopio de Azevedo que durante a iniciação científica acompanharam parte da execução do estudo contribuído no trabalho e pela troca de experiência.

Obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho, para meu aprendizado e crescimento profissional.

“Aprendi com as primaveras a deixar-me
cortar e a voltar sempre inteira”.

Cecília Meireles.

Rabello, V.B.S. Impacto de métodos de preservação na caracterização por taxonomia polifásica de isolados de *sporothrix* spp.. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

Os métodos de preservação empregados em micologia buscam manter a viabilidade e a estabilidade das características fenotípicas e genéticas. Entretanto, alterações podem ocorrer dependendo da metodologia empregada. Atualmente são escassos os dados da estabilidade dos isolados de *Sporothrix* spp., incluindo perfis fenotípicos, genotípicos e proteômicos após o armazenamento. Com a recente descrição das novas espécies patogênicas, para o homem e outros mamíferos, torna-se necessário o armazenamento desses fungos em coleções de culturas para estudos futuros, possibilitando maior conhecimento sobre a taxonomia, fisiologia e virulência de *Sporothrix* spp. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar métodos de preservação que permitam manter a estabilidade dos perfis fenotípicos, genotípicos e proteômicos dos isolados de *Sporothrix* spp.. Com esse propósito foram utilizados 8 isolados de *Sporothrix* spp., armazenados por três diferentes métodos. Preservação em água destilada, sob refrigeração a 4°C e criopreservação a -80°C, por períodos de 6, 12, 18 e 24 meses de armazenamento. Os isolados foram identificados pelo sequenciamento parcial dos genes calmodulina e β -tubulina e pela PCR *fingerprinting*. A estabilidade do fenótipo foi realizada, por meio das provas fenotípicas sugeridas na chave de identificação das espécies de *Sporothrix* spp. que incluem: morfologia dos conídios, diâmetro da colônia a 30°C, teste de termotolerância a 37°C e assimilação de carboidratos, glicose sacarose e rafinose. O dimorfismo também foi avaliado após a preservação. A estabilidade genotípica foi realizada por meio do sequenciamento parcial do gene codificador da β -tubulina. A estabilidade proteômica foi realizada por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS), após 24 meses de preservação. Todos os isolados foram recuperados dos três métodos em todos os períodos avaliados. No entanto, os isolados preservados em água destilada apresentaram contaminações. Alterações morfológicas foram observadas após preservação a -80°C, um isolado deixou de apresentar colônia pigmentada e conídios demáceos. O diâmetro das colônias assim como a termotolerância permaneceram estáveis nos três métodos. A principal alteração ocorreu com o perfil de assimilação de carboidratos e essa variação modificou a identificação das espécies pela chave taxonômica. A estabilidade genotípica para o gene codificador da β -tubulina foi preservada após 24 meses em ambos os métodos de armazenamento. Entretanto, baixo polimorfismo foi detectado após preservação em água destilada. Os isolados foram identificados corretamente por espectrometria de massa após o armazenamento, porém alterações no perfil proteico foram observadas. O método de preservação a 4°C foi o mais efetivo para preservar os isolados de *Sporothrix* spp., manteve estável a maioria das características fenotípicas, como também a estabilidade do genótipo por até 24 meses de armazenamento. Esse é um método simples e de baixo custo que pode ser usado em laboratórios de recursos limitados como, um método alternativo de preservação.

Palavras chaves: Preservação, *Sporothrix* spp., Fenótipo e Genótipo

Rabello, V.B.S. Impact of preservation methods on the polyphase taxonomy characterization of *sporothrix* spp. isolates. Rio de Janeiro, 2017. (Science Dissertattion in Clinic Research in Infectious Diseases) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

ABSTRACT

The preservation methods employed in mycology seek to maintain viability and stability of phenotypic and genotypic characteristics. However, changes may occurred pending on the methodology used. Currently, data on the stability of *Sporothrix* spp. isolates, including phenotypic, genotypic characteristics and proteomic profiles after storage, are scarce. With the recent description of the new pathogenic species, it is necessary to store these fungi in fungi collections for future studies, allowing greater knowledge about the taxonomy, physiology and virulence of *Sporothrix* spp. Therefore our objective was to evaluated preservations methods to maintain the stability the of phenotype, genotype and proteomic profile the isolates of *Sporothrix* spp.. With this purpose, 8 isolates were evaluated, these isolates were stored by three methods, preservation in distilled water, at 4°C and cryopreservation at -80°C for periods of 6, 12, 18 and 24 months of storage. Isolates were identified by partial sequencing of the calmodulin and β -tubulin genes and by fingerprinting PCR. The phenotype stability was carried out by phenotypic tests suggested in key identification of *Sporothrix* spp. which include: conidial morphology, colony diameters at 30°C, thermotolerance at 37°C and carbohydrate assimilation, also was evaluated the dimorphism. Genotypic stability was achieved by partial sequencing of β -tubulin gene. The proteomic stability was performed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). All isolates were recovered from the three methods in all evaluated periods. However, the isolates preserved in sterile distilled water presented contaminations. Morphological changes were observed after preservation at -80°C, one isolates howed no pigmented conidia and colony. The diameter of the colonies as well as the thermotolerance remained stable in all three methods. The main alteration occurred with the carbohydrate assimilation and this variation modified the identification of the species by the taxonomic key. Genotypic stability was preserved after 24 months in both storage methods, the low polymorphisms were detected after store in sterile water. All the isolates were correctly identified by mass spectrometry after 24 months of storage, although changes in protein profiles were observed. The preservation method at 4°C was the most effective to preserve the isolates of *Sporothrix* spp. It maintained stable most of the phenotypic characteristics, as well as the stability of the genotype. This is a simple and inexpensive method that can used in limited resource labs as an alternative method of preservation.

Keywords: Preservation, *Sporothrix* spp., phenotype, genotype

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 Preservação de Microrganismos	16
1.2.1 Importância	16
1.2.2 Coleções brasileiras.....	17
1.2.2 Métodos de preservação	19
1.2.2.1 Repicagem contínua ou periódica	20
1.2.2.2 Óleo mineral.....	22
1.2.2.3 Água destilada	23
1.2.2.4 Congelamento comum.....	24
1.2.2.5 Criopreservação	25
1.2.2.6 Liofilização.....	27
1.3.1 Agente etiológico	31
1.3.2 Morfologia	32
1.3.3 Filogenia.....	33
1.3.4 Identificação de <i>Sporothrix</i> spp.....	35
1.3.5 Fatores de virulência.....	37
2 JUSTIFICATIVA	40
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo Geral.....	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4 MÉTODOS	43
4.1 Microrganismos.....	43
4.2 Re-isolamento das Cepas Controles.....	43
4.3 Caracterização dos Isolados por Taxonomia Polifásica.....	44
4.3.1 Provas de caracterização fenotípica dos isolados.....	44
4.3.1.1 Características morfológicas dos conídios	44
4.3.1.2 Crescimento das colônias em meio PDA	45
4.3.1.3 Termotolerância	45
4.3.1.4 Assimilação de Carboidratos	45
4.3.2 Métodos Moleculares.....	46
4.3.2.1 Extração de DNA	46
4.3.2.2 Sequenciamento.....	47

4.3.2.3 T3B PCR <i>fingerprinting</i>	48
4.4 Métodos de Preservação	48
4.4.1 Preservação em água destilada	49
4.4.2 Preservação a 4°C	49
4.4.3 Criopreservação	50
4.5 MALDI-TOF MS	50
4.6 Análises dos Dados	51
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Caracterização dos Isolados por Taxonomia Polifásica.....	53
5.1.3 Métodos Moleculares.....	56
5.2 Métodos de Preservação	59
5.2.1 Viabilidade e pureza	59
5.2.2 Estabilidade Fenotípica	60
5.2.2.1 Características morfológicas dos conídios	62
5.2.2.2 Crescimento das colônias em meio PDA termotolerância e dimorfismo	63
5.2.2.3 Assimilação de carboidratos.....	64
5.2.3 Estabilidade Genotípica.....	65
5.2.4 MALDI-TOF MS	67
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	78
8 PERSPECTIVAS PARA O TRABALHO.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de coleções de culturas registradas na WDCM por regiões.....	15
Tabela 2. Chave de identificação taxonômica para as espécies do complexo <i>Sporothrix</i>	34
Tabela 3. Identificação fenotípica antes do armazenamento	55
Tabela 4. Contaminação após preservação em água destilada	60
Tabela 5. Alterações fenotípicas após 24 meses de preservação.....	61
Tabela 6. Diâmetro das Colônias.....	64
Tabela 7. Alteração na assimilação da sacarose após preservação	65

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema do teste de assimilação de carboidratos..	46
Figura 2. Descrição da técnica de MALDI-TOF MS.....	51
Figura 3. Macromorfologia de <i>Sporothrix</i> spp.....	53
Figura 4. Micromorfologia de <i>Sporothrix</i> spp.....	54
Figura 5. Conídio triangular.....	54
Figura 6. Imagem demonstrativa da amplificação parcial do gene codificador da calmodulina.....	56
Figura 7. Imagem demonstrativa da amplificação parcial do gene codificador da β -tubulina.....	56
Figura 8. Árvore filogenética do gene codificador da calmodulina.....	57
Figura 9. Árvore filogenética do gene codificador da β -tubulina.....	58
Figura 10. T3B PCR <i>fingerprint</i>	59
Figura 11. Diferenças morfológicas após criopreservação a -80°C	62
Figura 12. Estabilidade genotípica.....	66
Figura 13. Árvore filogenética MALDI-TOF MS.....	68
Figura 14. Perfil proteômico do MALDI-TOF MS para um isolado de <i>S. brasiliensis</i>	69

Lista de Símbolos

- ATCC - *American Type Culture Collection*.
- BCCM - *Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms*.
- BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro.
- BHI - *brain heart infusion*.
- BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* – NIH.
- CBILMD - Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane.
- CBMAI - Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Industria.
- CBS - *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*.
- CCFF - Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos.
- CCT-UFMG - Centro de Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- CDB - Convenção sobre Diversidade Biológica.
- CFAM - Coleção de Fungos da Amazônia.
- CFP - Coleção de Fungos Patogênicos.
- CFRVS - Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária.
- CHCA - ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico.
- CMRVS - Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária.
- CMA - *corn meal agar*.
- CMT - Coleção Micológica de *Trichocomaceae*.
- CO₂ - dióxido de carbono.
- DMSO - dimetil sulfóxido.
- DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
- Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz.
- FMR - Facultat de Medicina i Cienècies de la Salut.
- IBI - Instituto Biológico de São Paulo.
- INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
- INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.
- IOC - Instituto Oswaldo Cruz.
- IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.
- ITS - espaço de transcrição interna
- JCM - *Japan Collection of Microorganisms*.

LTBBF - Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos.

MALDI-TOF MS - *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*.

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico.

PDA - ágar-batata-dextrose.

RAPD - reação de polimerase em cadeia com sequências iniciadoras arbitrárias.

RCA - *Rolling Circle Amplification*.

RFLP - polimorfismo de fragmentos de DNA gerados após digestão com enzimas de restrição.

SARAMIS® - *Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnos Tec, Postdam-Golm*.

TES - tris etilenodiamino tetracético.

TFA - ácido trifluoroacético.

UFC - unidades formadoras de colônia.

URM - University Recife Mycologia.

WDCM - *World Data Center for Microorganism*.

WFCC - *World Federation for Culture Collections*.

YNB - *yeas nitrogen base*.

1 INTRODUÇÃO

Coleções biológicas são conjuntos de materiais biológicos, compostas por organismos ou partes destes. A exemplo as coleções de plantas, animais e microrganismos (atuais ou fósseis), os quais devem estar devidamente preservados e documentados de acordo com normas e padrões, que garantam a segurança, qualidade, integridade e longevidade dos organismos preservados (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ, 2005; 2017; KURY et al., 2006).

As coleções mantêm representantes da biodiversidade, sendo representantes do patrimônio nacional e cultural. Fornece informações importantes para taxonomistas, como distribuição geográfica, diversidade morfológica, relações filogenéticas e evolução das espécies. Além de contribuir para outras áreas do conhecimento, sendo utilizadas em pesquisas nas áreas da saúde, pesquisas epidemiológicas, na área ambiental, industrial e na agricultura. E os espécimes preservados nessas coleções também são fontes para a obtenção de vários produtos biotecnológicos (KURY et al., 2006; *WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS - WFCC*, 2010).

As coleções microbiológicas diferem das coleções botânicas e zoológicas, têm como principal função aquisição, caracterização, preservação e distribuição de microrganismos e células autenticadas. Devido a essas características, devem seguir regras de biossegurança (*biosafety*), utilizar princípios de contenção, e práticas para prevenir a exposição involuntária a agentes patogênicos, as toxinas, ou a sua liberação acidental no ambiente. Além de aplicar regras de bioproteção (*biosecurity*), com finalidade de impedir o uso indevido de materiais biológicos patogênicos, organismos produtores de toxinas, bem como suas toxinas, uma vez que os mesmos materiais biológicos utilizados para o benefício em diversos setores da ciência podem ser usados com finalidade nociva em bioterrorismo (FIOCRUZ, 2005; WFCC, 2010; Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OCDE, 2012). As coleções microbiológicas devem também, apresentar alto grau de qualidade, pois os materiais biológicos presentes nas coleções são utilizados para pesquisas científicas e aplicados em diversos produtos biotecnológicos. Portanto é fundamental que as culturas estejam puras, autenticadas e preservadas, de modo a garantir a sobrevivência nas mesmas condições originais (FIOCRUZ, 2005; OCDE, 2012).

As primeiras coleções de culturas surgiram a partir da necessidade dos próprios pesquisadores em manter suas cepas. A primeira coleção de serviço estruturada foi a Coleção Kral, fundada em Praga em 1890, com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas (CANHOS, 2003; FIOCRUZ, 2005). No início do século XX, outras coleções de serviço foram estabelecidas na Europa, Estados Unidos e Japão, com a finalidade básica de preservar e fornecer material de referência para estudos taxonômicos e monitoramento epidemiológico.

Com o advento da tecnologia, as coleções passaram por um contínuo processo de desenvolvimento, visando atender as demandas decorrentes dos avanços na microbiologia industrial (década de 1960), biotecnologia (década de 1980) e engenharia genética e genômica (década de 1990) (CANHOS, 2003; FIOCRUZ, 2005).

Atualmente existem 754 coleções de cultura distribuídas em 76 países e regiões, membro da *World Federation for Culture Collections*, (WFCC), registradas no *World Data Center for Microorganism* (WDCM), tabela 1. Nessas coleções 26.827 mil espécies de fungos filamentosos e leveduras, 16.495 mil espécies de bactérias e 1.126 mil espécies de vírus estão preservadas (WDCM, 2018). O Brasil possui o maior número de coleções registradas, com 81 coleções de culturas (WDCM, 2018).

Tabela 1. Número de coleções de culturas registradas na WDCM por regiões

Região	Coleções
América	189 em 12 países
Europa	243 em 33 países
África	13 em 7 países
Ásia	268 em 20 países
Oceania	41 em 4 países

Algumas importantes coleções mundiais, atuam como centros de excelência em conservação *ex situ* e são consideradas Centros de Recursos Biológicos, as quais devem atender aos elevados padrões de qualidade e especialização exigidos pela comunidade internacional científica e industrial. Como por exemplo, a *American Type Culture Collection* (ATCC), nos Estados Unidos, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ), na Alemanha, *Westerdijk Fungal*

Biodiversity Institute (CBS) na Holanda, Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms (BCCM), na Bélgica, Japan Collection of Microorganisms (JCM), no Japão (FIOCRUZ, 2005; OCDE, 2012).

1.2 Preservação de Microrganismos

1.2.1 Importância

Os microrganismos desempenham papéis ecológicos essenciais, além de possuírem potencial uso para a produção biotecnológica, embora alguns sejam patógenos para humanos, animais e plantas (CANHOS, 2003; FIOCRUZ, 2005; CHAMBERGO e VALENCIA, 2016).

São responsáveis pela ciclagem dos compostos orgânicos e degradam poluentes presentes no ambiente. Cooperam na recuperação do meio ambiente, por meio da biorremediação e por essas características contribuem para a estabilidade dos ecossistemas. Alguns microrganismos são fixadores de nitrogênio no solo, outros podem ser utilizados também no setor da indústria agropecuária no controle de pragas agrícolas, reduzindo o uso de agrotóxicos. Além disso, são utilizados na produção de produtos biotecnológicos, na área da indústria alimentícia e farmacêutica possuindo importante valor econômico (CANHOS, 2003; MELLO, SILVA e WETZEL, 2003; SMITH, 2003; FIOCRUZ, 2005).

Existem 120 mil espécies de fungos descritas, porém estima-se que a diversidade possa ser cerca de 1,5 milhão de espécies (HAWKSWORTH e LÜCKING, 2017). Desse modo, para conhecer melhor os fungos, assim como outros microrganismos é importante realizar o armazenamento em coleções de culturas.

As coleções de culturas microbiológicas são bases de informações para pesquisas e ensino, sendo fontes de estudos em epidemiologia, taxonomia e diagnóstico, além de sua utilização nos diferentes campos da biotecnologia, geração de conhecimento e conservação da biodiversidade (FIGUEIREDO, 2001; PAOLI, 2005; OCDE, 2012; HOFLING e GONÇALVES, 2016).

A conservação de recursos genéticos microbianos constitui prática fundamental ao desenvolvimento científico e tecnológico (MELLO, SILVA e WETZEL, 2003). Nesse contexto, as coleções biológicas têm papel importante. A Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) determina que os países estabeleçam e mantenham

instalações para a conservação *ex situ* e para pesquisas nas áreas vegetal, animal e de microorganismo, de preferência no país de origem. A CDB foi produzida durante Conferência Mundial para o Meio Ambiente e o Desenvolvimento, realizada em 1992 no Rio de Janeiro, Brasil, sendo fundamental que os países com grande diversidade biológica invistam e recebam apoio internacional para a ampliação e melhoria da infraestrutura de suas coleções biológicas (KURY et al., 2006).

1.2.2 Coleções brasileiras

O Brasil é um país que possui a maior diversidade biológica do planeta, com cerca de 20% de toda a biodiversidade mundial, de animais, plantas e de microrganismos, muitos dos quais ainda não foram estudados ou relatada a sua existência. Além de possuir biomas como a Mata Atlântica e Cerrado, considerados *hotspots*, regiões com grande concentração de espécies endêmicas, porém com grande ameaça de extinção (FIOCRUZ, 2005, KURY et al., 2006). Apesar de toda a biodiversidade presente no território brasileiro, em 2005 o país possuía apenas 1% do acervo biológico representado nas coleções biológicas (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2005).

As principais coleções do Brasil encontram-se em instituições de pesquisas, como a coleção do Prof. Lacaz no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, a Micoteca Mário Barreto Figueiredo no Instituto Biológico de São Paulo (IBI), a qual reúne principalmente fungos de interesse fitopatogênico e outras importantes coleções (FIGUEIREDO, 2001).

O Centro de Coleções Taxonômicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CCT-UFMG), composto por 25 coleções. O qual reúne coleções zoológicas, botânicas, microbiológicas, composta por bactérias, leveduras e fungos filamentosos. E uma coleção denominada especial, com um acervo de paleontologia, tecidos e DNA, células vivas e extratos (UFMG, 2018).

A Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI), criada em 2002, tem como missão atuar como Centro de Recursos Biológicos conforme definido pela OCDE. Seu acervo é direcionado para linhagens microbianas de aplicação biotecnológica, educacional e taxonômica. Contém material biológico restrito aos grupos de riscos 1 e 2, incluindo bactérias, arqueias, fungos filamentosos e leveduriformes (CBMAI, sem ano).

O Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), criado em 1980 é considerado um centro de referência e excelência em cultura de células. Foi o pioneiro no Brasil no serviço de congelamento de células do cordão umbilical. É o maior banco de células da América Latina com mais de 400 linhagens celulares de diversas origens, desde humana à diversos tipos de animais e também de insetos (BCRJ, sem ano).

Na área da Agropecuária destacam-se as coleções científicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, as quais mantêm um acervo de diferentes grupos de plantas, animais e microrganismos. Incluindo coleções de bactérias, fungos e vírus, que podem ter diversas aplicações, entre as quais se destaca a utilização de agentes no controle biológico de insetos e pragas agrícolas (EMBRAPA, sem ano).

Na área da saúde destaca-se a Fiocruz, atualmente há 31 coleções reconhecidas institucionalmente, que estão divididas em quatro categorias: coleções zoológicas, coleção de botânica, coleção histopatológica e coleções microbiológicas. Constituem a memória epidemiológica e o registro de variações ocorridas com agentes etiológicos ao longo do tempo. Além de possuir um acervo microbiológico com potencial uso biotecnológico, na produção de insumos para diagnóstico, vacinas e medicamentos (FIOCRUZ, sem ano). Uma variedade de coleções fúngicas pode ser destacada na Fiocruz.

Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF) criada em 1922, composta por um acervo de 1.680 linhagens de diferentes grupos taxonômicos, localizada no Instituto Oswaldo Cruz (IOC) Rio de Janeiro, a qual faz parte integrante do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos (LTBBF/IOC) (FIOCRUZ, 2018).

Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) criada em 2008, com o objetivo de reunir linhagens de fungos patogênicos. O acervo reúne agentes de micoses cutâneas, subcutâneas, oportunistas e sistêmicas, representando espécies de patógenos humanos e de animais, localizada no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Rio de Janeiro (FIOCRUZ, 2018),

Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM), composta por fungos filamentosos, está inserida na Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane (CBILMD) em Manaus, possui um acervo relevante de linhagens isoladas de diferentes substratos da Amazônia brasileira, região ainda pouco conhecida principalmente quanto à sua riqueza microbiana (FIOCRUZ, 2018).

Coleção Micológica de *Trichocomaceae* (CMT), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Rio de Janeiro, criada em 1997, seu acervo é composto por 505 culturas fúngicas e tem como finalidade preservar, distribuir e identificar fungos da família *Trichocomaceae*, principalmente as cepas potencialmente produtoras de micotoxinas, isoladas de produtos agrícolas e rações para produção animal, destacando-se as espécies do gênero *Aspergillus* (FIOCRUZ, 2018)

Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS), localizada no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). (SILVA, 2018).

Outra importante coleção de fungos é a Coleção de Culturas Micoteca URM (University Recife Mycologia) do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. Fundada em 1954, seu acervo consta com aproximadamente 201 espécies de leveduras e cerca de 1.200 espécies de fungos filamentosos (Universidade Federal de Pernambuco, 2018).

As coleções de culturas microbiológicas têm como importante desafio a preservação e manutenção dos organismos sem que estes sofram alterações morfológicas, fisiológicas e genéticas além de evitar possíveis contaminações. Dessa forma torna-se importante os estudos e aprimoramento dos métodos utilizados para preservar os microrganismos a longo prazo (FIGUEIREDO, 2001; PAOLI, 2005; WFCC, 2010; OCDE 2012; HOFLING e GONÇALVES, 2016).

1.2.2 Métodos de preservação

Os métodos de preservação devem manter a viabilidade, as características morfológicas, fisiológicas e genéticas dos microrganismos. Entretanto, alterações fenotípicas, bioquímicas e na estabilidade do genótipo podem ocorrer, podendo induzir a erros na identificação dos microrganismos (RODRIGUES, LÍRIO e LACAZ, 1992; DA SILVA, BORBA e DE OLIVEIRA, 1994; SMITH, RYAN e DAY, 2001; LIMA et al., 2004; MENDOZA et al., 2005; BORMAN et al., 2006; APARECIDO, 2007; CAVALCANTE et al., 2007; FINATTI et al., 2009; BROUGHTON et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2013; FREIRE et al., 2016; KARABIÇAK, KARATUNA e AKYAR, 2016). A correta identificação e preservação de microrganismos são características fundamentais para o estabelecimento de uma coleção de cultura. Permitindo que os isolados estejam disponíveis para utilização em estudos posteriores durante várias gerações, bem como por fazerem parte de um patrimônio nacional, sendo, portanto,

importante a avaliação dos diferentes métodos de preservação (WFCC, 2010 OCDE, 2012; PIRES, APARECIDO e FINATTI, 2012; APARECIDO e CAMILO, 2013; HOFLING e GONÇALVES, 2016).

1.2.2.1 Repicagem contínua ou periódica

A técnica de repique contínuo, também chamado de subcultivo ou repicagem periódica, é um método simples e tradicional de manutenção de culturas em laboratório. É uma das técnicas mais antigas de preservação e por meio dessa técnica vários organismos têm sido preservados para garantir a viabilidade, sendo utilizada na preservação de certos grupos de fungos que não poderiam ser submetidos a outros métodos (FIGUEIREDO, 2001; HOMOLKA, 2014).

Em fungos, o método clássico de preservação por repicagens periódicas consiste no subcultivo do organismo cultivado em tubos de ensaio contendo meios adequados. Os tubos de ensaio devem ser preparados com ágar inclinado possibilitando um melhor aproveitamento da área para o cultivo (HOFLING e GONÇALVES, 2016). É recomendável o uso de meios naturais, que proporcionem o mínimo de crescimento micelial, dessa forma previne o aparecimento de modificações e que possibilitem o máximo desenvolvimento de suas estruturas de reprodução ou outras estruturas de propagação e resistência. Para a preservação das culturas esporulantes devem-se ser utilizados os esporos no repique, ao invés do micélio, pois os esporos tendem a manter melhor a integridade das características originais (FIGUEIREDO, 2001).

Vários meios de cultura podem ser utilizados no cultivo de fungos e alguns são apropriados para uma grande variedade de espécies, como por exemplo, ágar Sabouraud dextrose, ágar-batata-dextrose (PDA), Malte-ágar, V8-ágar (extrato de oito legumes mais ágar), aveia-ágar, ágar Czapeck (meio sintético com sais minerais e açúcares) e cenoura-ágar, porém alguns fungos podem apresentar alguma exigência nutricional, sendo necessários outros meios de culturas (FIGUEIREDO, 2001; ANVISA, 2013).

Esse método de preservação deve ser realizado a cada três ou quatro meses antes que os nutrientes do substrato sejam completamente consumidos. Além de ser um trabalho exaustivo, tende a produzir alterações nas cepas que podem deixar de apresentar algumas características da cultura original ou podem adquirir outras em

decorrência da constante manipulação. Podendo sofrer também influência da ação mutagênica de seus próprios metabólitos, sendo o teor aumentado diretamente proporcional com a idade da cultura. Dessa forma, as culturas mais antigas tendem a produzir culturas-filhas alteradas e quanto maior a idade, maior a possibilidade de ocorrerem alterações nas divisões mitóticas pelo acúmulo de metabólitos mutagênicos no substrato. Por essa razão as culturas antigas estão mais suscetíveis a alterações irreversíveis. (FIGUEIREDO, 2001; PATERSON e LIMA, 2013).

Ao realizar essa técnica deve-se ter muito zelo e assepsia. Há a necessidade constante de vigilância dos tubos de cultura, devido a contaminações por invasão de outros fungos e bactérias ou a contaminação por ácaros micófagos, sendo esse um dos maiores problemas para perda das culturas (FIGUEIREDO, 2001). Também é recomendado evitar tubos hermeticamente fechados enquanto o fungo estiver crescendo, pois embora isso previna a perda de água e desidratação do meio de cultura, o acúmulo de gases provenientes do metabolismo, como por exemplo, o CO₂, tem efeito deletério sobre as culturas (FIGUEIREDO, 2001).

O método de preservação por repiques contínuos pode ser aprimorado, após o crescimento inicial, as culturas podem ser mantidas em ambiente refrigerado entre 4°C e 8°C, com isso o metabolismo do fungo é reduzido e conseqüentemente o crescimento micelial e das leveduras, quando armazenadas a essa temperatura em ágar inclinado por alguns meses (KÖNIG e BERKELMANN-LÖHNERTZ, 2017; STEWART, 2017). O subcutivo também pode ser realizado em meio líquido e após o crescimento inicial a cultura deve ser armazenada a 4°C (GONÇALVES, 2016). Por meio dessa alternativa de preservar a temperatura refrigerada, os repiques periódicos podem ser realizados em um intervalo maior entre os cultivos, de cinco a seis meses ou mesmo por períodos maiores, promovendo uma menor manipulação das cepas e evitando maiores alterações fenotípicas e genotípicas. Além disso, à temperatura refrigerada promove a perda da mobilidade dos ácaros (FIGUEIREDO, 2001; HOMOLKA, 2014; BRILHANTE et al., 2015).

No entanto, outros métodos foram desenvolvidos que permitissem a preservação por longos períodos, evitassem possíveis variações e que fossem menos dependentes do trabalho humano. Cada método, porém, pode apresentar resultados distintos em relação à viabilidade, estabilidade morfológica, fisiológica e genética, sendo empregados de acordo com as características de cada espécie e avaliação das vantagens e desvantagens, bem como devem ser selecionadas de acordo com a

infraestrutura disponível pelo laboratório (FIGUEIREDO, 2001; HOFLING e GONÇALVES, 2016).

1.2.2.2 Óleo mineral

Método antigo na preservação de microrganismos utilizado inicialmente por Lumière e Chevrotier, em 1914, para preservar bactérias do gênero *Gonococcus*, aumentando a longevidade e reduzindo a variabilidade da cultura por alguns meses. O método foi aprimorado ao longo dos anos, sendo aplicado para outras bactérias e na preservação de fungos (MORTON e PULASKI, 1938; FIGUEIREDO, 2001). Foi amplamente aplicado para espécies miceliais ou formas não esporulantes, sensíveis a outros métodos de preservação (FIGUEIREDO, 2001; HOMOLKA 2014).

Esse método de preservação consiste em recobrir com óleo mineral culturas jovens desenvolvidas em tubos de ensaio. Deve-se aplicar óleo mineral estéril com pureza elevada, não tóxico para o organismo. Utilizar o óleo de parafina medicinal ou parafina líquida e toda a superfície da cultura precisa ser totalmente recoberta pelo óleo para não ocorrer perda de água (MORTON e PULASKI, 1938; FIGUEIREDO, 2001). Dessa forma previne a desidratação do meio de cultura e promove a redução da atividade metabólica microbiana, por meio da diminuição dos níveis de oxigênio, uma vez que o óleo permite uma lenta difusão de gases. No entanto, uma alta camada de óleo sobre as culturas pode provocar efeitos deletérios (FIGUEIREDO, 2001).

As culturas preservadas em óleo são armazenadas à temperatura ambiente (FIGUEIREDO, 2001; HOMOLKA 2014). O método de preservação em óleo mineral permite a utilização de uma mesma cultura preservada várias vezes, possui baixo custo, pode ser aplicado em qualquer laboratório, não necessita de equipamentos especializados. Possibilita a preservação das culturas por longos períodos, podendo ultrapassar 20 anos e reduz a contaminação por ácaros (LIMA, 1991; BORBA et al., 1992; NEUFELD e SARQUIS, 2003; HOMOLKA 2014).

Embora muitos fungos possam ser preservados por esse método, a taxa de sobrevivência pode diminuir com o tempo de armazenamento e variações nas características após longo período de preservação podem ocorrer e também contaminações (DA SILVA, BORBA e OLIVEIRA, 1994; BORBA e RODRIGUES, 2000; LIMA e BORBA, 2001; BORBA e SCHÄFFER, 2002; LIMA, SCHÄFFER e BORBA, 2003; LIMA et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2013; FREIRE et al. 2016).

Em um estudo de Borba et al. (1992) referente a viabilidade e a estabilidade morfológica de isolados de *S. schenckii lato sensu* preservados em óleo mineral por período de até 41 anos, demonstrou que dos 33 isolados preservados, 28 foram recuperados mantendo as características morfológicas macroscópicas e microscópicas estáveis. No entanto outros estudos demonstram que alguns isolados de *S. schenckii lato sensu*, assim como de outros fungos patogênicos, *Histoplasma capsulatum var. capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis* após serem preservados em óleo mineral sofreram alterações, perderam a capacidade de completar o dimorfismo *in vitro* ou *in vivo*, além da perda da virulência em modelo murino, após inoculação intravenosa. Demonstrando menor capacidade invasiva das cepas preservadas óleo mineral (DA SILVA, BORBA e DE OLIVEIRA, 1994; LIMA e BORBA, 2001; LIMA, SCHÄFFER e BORBA, 2003; LIMA et al., 2004).

1.2.2.3 Água destilada

O método de preservação em água destilada, conhecido também como método de Castellani, foi desenvolvido em 1938 por Aldo Castellani (CASTELLANI, 1939). O método consiste em transferir pedaços de meio de cultura contendo o micélio do fungo a ser preservado para frascos de vidro contendo água destilada, os quais devem ser vedados e mantidos à temperatura ambiente (CASTELLANI, 1939; FIGUEIREDO, 2001). O método é descrito como simples, de fácil realização e baixo custo, tem sido empregado para uma variedade de gêneros e espécies de fungos, demonstrado bons resultados quanto à preservação das características, viabilidade e virulência das culturas fúngicas, após longos períodos de preservação (FIGUEIREDO, 2001; DIOGO, SARPIERI e PIRES, 2005; FINATTI e APARECIDO, 2009; PASSADOR et al., 2010; PIRES, APARECIDO e FINATTI, 2012; GUIMARÃES et al. 2014; PALACIO et al. 2014; FREIRE et al. 2016; KARABIÇAK, KARATUNA e AKYAR, 2016).

Mendoza et al. (2005) demonstraram 100% de viabilidade em cinco isolados de *S. schenckii lato sensu* após 18 anos de preservação em água destilada. Assim como De Capriles et al. (1993), também verificaram a viabilidade em cinco isolados de *S. schenckii lato sensu* preservados por até 16 anos em água destilada, além de ter sido analisado a virulência após o armazenamento. Os isolados encontravam-se morfológicamente estáveis e viáveis, sendo capazes de causar esporotricose disseminada em modelo murino. Utilizando esse mesmo método de armazenamento

Borba et al. (1992) demonstraram a preservação da viabilidade e das características morfológicas em 4 isolados de *S. schenckii lato sensu* armazenados por até 23 anos, evidenciando que a preservação em água destilada pode ser um método alternativo para laboratórios de recursos limitados.

1.2.2.4 Congelamento comum

A preservação de microrganismos por congelamento comum é realizada a temperaturas relativamente baixas entre -4 e -20°C. É considerado um método simples e de baixo custo. Na realização do processo é necessário o uso de substâncias protetoras, chamados de agentes crioprotetores. São compostos adicionados à suspensão celular para minimizar os danos do congelamento e descongelamento (SAEKI, FARHAT e PONTES 2015). Dentre os crioprotetores utilizados podem ser citados, o leite desnatado, dimetil sulfóxido (DMSO), meio líquido nutritivo com glicerol, ou apenas o glicerol (AGUIAR, 2012; SAEKI, FARHAT e PONTES 2015).

Os crioprotetores devem possuir baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular. São classificados tradicionalmente quanto à sua capacidade de penetração nos materiais biológicos (AGUIAR, 2012).

Os crioprotetores penetrantes ou intracelulares realizam ligações com as moléculas de água minimizando a formação e o tamanho dos cristais de gelo, reduzindo também as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no meio intracelular (AGUIAR, 2012). Segundo Aguiar (2012), os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são capazes de induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, dessa forma preveni a formação de cristais de gelo. São apropriados à preservação de microrganismos por se fixarem à superfície microbiana formando uma camada viscosa capaz de proteger mais efetivamente suas paredes celulares e membranas. Os crioprotetores também podem proteger os microrganismos e suas proteínas contra desidratação, destruição térmica e radiação (AGUIAR, 2012).

A preservação por congelamento comum reduz o metabolismo celular e apresenta como vantagens, por ser um método simples, menos oneroso, não requer equipamentos sofisticados. Permite a preservação de isolados por alguns anos, porém por um período menor quando comparada a criopreservação, que também

utiliza temperaturas negativas no armazenamento (PASARELL e MCGINNIS, 1992; FIGUEIREDO, 2001; SILVA, COSTA e RECHE, 2008).

A redução da viabilidade celular pode ocorrer na preservação por congelamento comum, em função dos danos causados às células pela formação de cristais de gelo, durante o congelamento. E variações na temperatura dos freezers também pode comprometer a qualidade e viabilidade dos microrganismos preservados (WOLFE e BRYANT, 2001; AGUIAR et al., 2012).

1.2.2.5 Criopreservação

O método de criopreservação consiste na preservação de materiais biológicos sob baixas temperaturas (-70°C ou -80°C) em freezers especiais e a ultrabaixas temperaturas (-130 a -196°C) em nitrogênio líquido (AGUIAR et al., 2012; PRAKASH, NIMONKAR e SHOUCHE, 2012).

Existem duas formas básicas de armazenamento em nitrogênio líquido. Na primeira os criotubos utilizados para a preservação são imersos no líquido, sendo armazenados a -196°C e na outra podem ser colocados acima do nível do líquido, na fase de vapor do nitrogênio a -130°C. No sistema de armazenamento na fase líquida existe o risco do líquido entrar nos criotubos incorretamente vedados podendo ocorrer explosão quando a cultura for recuperada. Por esse motivo, é recomendado o armazenamento na fase de vapor (PRAKASH, NIMONKAR e SHOUCHE, 2012; *American Type Culture Collection - ATCC*, 2013).

A criopreservação permite a redução do metabolismo celular. À medida que a temperatura diminui, o organismo permanece em estado de latência pela interrupção da atividade celular, sendo suas funções retomadas após o descongelamento, quando o isolado for recuperado em meio apropriado (AGUIAR et al., 2012). Uma variedade de tipos celulares pode ser preservado por esse método, como as células de animais e vegetais, bactérias, fungos, vírus e tecidos (WOLFE & BRYANT, 2001; COSTA et al., 2009; AGUIAR et al., 2012).

Para a realização da criopreservação também é necessário o uso de substâncias crioprotetoras, que minimizem os danos do congelamento sobre as células a serem preservadas (FIGUEIREDO, 2001; AGUIAR et al., 2012; PRAKASH, NIMONKAR e SHOUCHE, 2012). Cristais de gelos são formados no meio intracelular, decorrente das baixas temperaturas o que pode provocar rompimento celular,

acarretando perda do material biológico e inviabilidade da cepa (AGUIAR et al., 2012). Uma taxa de resfriamento lento, geralmente -1°C a -10°C por minuto, pode diminuir os danos do congelamento. O procedimento padrão para a criopreservação é congelar o material lentamente até atingir uma temperatura abaixo de -70°C em meio que contenha um crioprotetor. Após, os frascos podem ser transferidos para o armazenamento em nitrogênio líquido (ATCC, 2013).

Para evitar os danos da crioinjúria, os crioprotetores têm como finalidade principal prevenir a formação de cristais de gelos, diminuir o ponto de congelamento da água e de fluidos biológicos (AGUIAR et al., 2012; PRAKASH, NIMONKAR e SHOUCHE, 2012). O principal crioprotetor utilizado é o glicerol, sendo o agente protetor recomendado pela *American Type Culture Collection* na preservação de células fúngicas (ATCC, 2013).

Uma das limitações para o desenvolvimento da criopreservação é a necessidade de equipamentos refrigeradores capazes de produzir temperaturas muito baixas, o que torna o método dispendioso no armazenamento de isolados a -70°C ou -80°C . Além desse fator, variações na temperatura dos freezers podem comprometer a qualidade dos isolados preservados (SU et al., 1996; FIGUEIREDO, 2001; WOLFE e BRYANT, 2001; PAOLI, 2005; AGUIAR et al., 2012). Enquanto o sistema de estocagem em nitrogênio líquido garante melhor o armazenamento, com temperaturas mais constantes e por longos períodos (PAOLI, 2005; AGUIAR et al., 2012). Dessa forma a preservação em nitrogênio líquido é o método de primeira escolha, sendo utilizado em muitos bancos de preservação microbiológica, pois promove a diminuição do metabolismo celular permitindo o armazenamento por longos períodos com menor risco de alterações genéticas (WFCC, 2010; OCDE, 2012; PRAKASH, NIMONKAR e SHOUCHE, 2012).

A aplicação da criopreservação foi descrita recentemente para isolados de *Sporothrix* spp. por Brilhante e colaboradores (2015). Isolados das espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. mexicana* e *S. globosa* foram armazenados por até nove meses a -80°C e todas as espécies foram recuperadas.

1.2.2.6 Liofilização

A liofilização é um método de preservação realizado em culturas que se encontram em estado de congelamento. A água é removida diretamente do material congelado em condições a vácuo, no liofilizador, sem a necessidade de aumento da temperatura o que poderia acarretar alterações. A água passa do estado sólido diretamente para o estado gasoso, processo este denominado de sublimação. A remoção da água presente em amostras biológicas viáveis em estado de congelamento apresenta-se como alternativa capaz de retardar o relógio biológico estabelecido pela natureza (FIGUEIREDO, 2001; SMITH, RYAN e DAY 2001; ATCC, 2013; HOFLING e GONÇALVES, 2016).

Essa técnica pode ser aplicada para uma variedade de microrganismos, sendo aplicada com sucesso na preservação de bactérias, leveduras e esporos de fungos filamentosos. Permite o armazenamento por longos períodos e mantém a viabilidade da maioria dos microrganismos, com exceção de algas e protozoários (SMITH, RYAN e DAY 2001). Como na criopreservação, é necessário a utilização de agentes protetores. Em geral as células ou os esporos são suspensos em substâncias protetoras, como leite desnatado, soro bovino, lactose, glicose e sacarose para minimizar danos do congelamento. O leite desnatado é um protetor adequado para fungos e às vezes é usado em combinação com inositol (FIGUEIREDO, 2001; SMITH, RYAN e DAY 2001; HOMOLKA, 2014). Após a realização do processo a cultura liofilizada pode ser mantida à temperatura ambiente, porém o ideal é armazenar a temperatura refrigerada de 4°C, protegido contra a umidade e ao oxigênio (SMITH, RYAN e DAY 2001; HOMOLKA, 2014).

Os fungos liofilizados podem ser recuperados pela reidratação em água destilada ou em caldo de carne e inoculados em seguida em meio apropriado, que possibilite a máxima recuperação das células. Uma vez em contato com o ar, o fungo deve ser imediatamente semeado para não perder a viabilidade. Por esse motivo, cada isolado liofilizado pode ser utilizado somente uma única vez, sendo portanto, necessário preparar algumas ampolas para cada isolado. E após a realização da técnica uma das ampolas com fungo liofilizado deve ser testada quanto à viabilidade para verificar se o fungo sobreviveu ao processo (FIGUEIREDO, 2001; ATCC, 2013).

O processo de liofilização pode causar perda do material biológico, pois poucas células fúngicas resistem ao método. Fungos que não esporulam e aqueles que

possuem esporos delicados ou grandes não resistem à preservação por essa técnica (FIGUEIREDO, 2001; APARECIDO et al., 2007; FINATTI e APARECIDO, 2009; PIRES, APARECIDO e FINATTI, 2012; HOMOLKA, 2014; PALACIO et al., 2014). Outras limitações estão no emprego de equipamentos especializados e de profissionais capacitados em sua realização, porém o método permite a facilidade de transporte dos isolados à temperatura ambiente, preservação por longos períodos sem alterações genéticas, pode ser aplicado para uma variedade de microrganismos, além de otimizar o espaço no laboratório, pois ocupa menos espaço para o armazenamento dos isolados (FIGUEIREDO, 2001; WFCC, 2010; OCDE, 2012; ALONSO, 2016).

A liofilização e a preservação em nitrogênio líquido, são os métodos mais recomendados para a preservação dos microrganismos a longo prazo. Para maior segurança no armazenamento e para minimizar a probabilidade de perda, devem ser sempre utilizados dois métodos diferentes de preservação para cada isolado e pelo menos um deve ser a liofilização ou a preservação em nitrogênio líquido (WFCC, 2010; OCDE, 2012).

1.3 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subcutânea de distribuição mundial, causada por algumas espécies do gênero *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007; CHAKRABARTI et al., 2015; ZHANG et al. 2015). É a principal micose subcutânea no Brasil, com alta incidência de casos, em especial no estado do Rio de Janeiro, que desde 1998 se caracteriza como uma área hiperendêmica da doença, com transmissão zoonótica pelo gato doméstico. Até o ano de 2011, 4.118 casos humanos de esporotricose foram diagnosticados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, centro de referência para tratamento dessa micose no Rio de Janeiro, com ausência de números atuais publicados. Nessa mesma instituição foram diagnosticados 4.703 gatos com esporotricose até 2015 e 244 cães até o ano de 2014. Devido ao alto número de casos o Rio de Janeiro é atualmente considerada uma região hiperendêmica de esporotricose, associada à transmissão pelo gato doméstico (SCHUBACH et al., 2005; SCHUBACH, BARROS e WANKE, 2008; REIS et al., 2009; BARROS et al., 2010; FREITAS et al., 2010; SILVA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; GUTIERREZ-GALHARDO et al. 2015; GREMIÃO et al. 2017; BOECHAT et al., 2018). É a maior epidemia por transmissão zoonótica de esporotricose já registrada no mundo, embora apenas nos últimos cinco anos passou a ser considerada uma doença de notificação compulsória no estado do Rio de Janeiro (BARROS et al., 2001, 2004; 2010; FREITAS et al., 2010; RESOLUÇÃO SES Nº674 de 12/07/2013; CHAKRABARTI et al., 2015; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2015 GREMIÃO et al., 2017).

Classicamente, a transmissão da esporotricose ocorre por inoculação traumática do fungo na pele, por meio de materiais que estejam contaminados pelo fungo, como o solo, espinhos de plantas e farpas de madeiras (DIXON et al. 1991; HAJJEH et al., 1997; MENDOZA et al., 2007; CRUZ et al., 2012; CHOAPPA, OYARZOA e SILVA, 2014; GOVENDER et al. 2015; MCGUINNESS et al. 2016).

Entretanto, a transmissão também pode ocorrer de forma zoonótica, fato presente na hiperendemia do Rio de Janeiro, tendo como importante fonte de transmissão da doença o gato doméstico. O contágio ocorre principalmente pela arranhadura e mordedura desses animais e também pelo contato com as lesões presentes nos felinos, pelo fato desses animais apresentarem alta carga parasitária nas lesões (SCHUBACH et al., 2005; REIS et al., 2009; BARROS et al., 2010;

CORDEIRO et al., 2011; SILVA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; GREMIÃO et al. 2017). A transmissão por outros animais também já foi relatada na literatura, como por exemplo, esporotricose transmitida por esquilo, roedores, tatu, cão, porém são casos esporádicos (SARAVANAKUMAR, ESLAMI e ZAR, 1996; BORREGO, MAYORGA e TARANGO-MARTÍNEZ, 2009; ALVES et al., 2010; RAMOS et al., 2017).

Raramente, a infecção pode ser adquirida por meio de inalação de conídios de *Sporothrix* spp. presentes no solo ou em cultivo pelo manuseio dos mesmos sem medidas de biossegurança adequadas (SINGHAI et al., 2012; SILVA et al., 2013).

A infecção em humanos, geralmente ocorre após um trauma com dano na integridade da epiderme, o fungo penetra na pele e após ocorre a conversão para a fase leveduriforme, podendo permanecer no tecido subcutâneo ou se estender ao longo dos vasos linfáticos adjacentes. A lesão primária ocorre geralmente nas extremidades, nos membros inferiores e superiores, locais mais expostos ao trauma, uma pápula ou pústula é formada, seguida de um nódulo subcutâneo. Havendo progressão, surgem lesões secundárias ao longo dos vasos linfáticos regionais, com "aspecto esporotricóide" da infecção, no entanto raramente pode disseminar por via hematogênica (BARROS, 2011; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011).

A esporotricose apresenta diferentes formas clínicas, as quais estão correlacionadas ao tamanho do inóculo, virulência fúngica, profundidade da inoculação e ao estado imunológico do hospedeiro. A forma linfocutânea é a mais comum nos casos diagnosticados, geralmente localizada nas extremidades superiores. Essa forma inicia a partir da lesão primária no local da inoculação, surgindo nódulos indolores que seguem o trajeto dos vasos linfáticos (BARROS, 2011; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011; OROFINO-COSTA et al., 2017).

Outra forma, a cutânea fixa, a segunda mais comum, é caracterizada por lesão única ou pequenas lesões restritas ao local da inoculação. As lesões em humanos são frequentemente ulceradas com bordas eritematosas e os vasos linfáticos não são afetados (BARROS, 2011; ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011; OROFINO-COSTA et al., 2017). Podem ocorrer também lesões na mucosa e na conjuntiva, nos gatos o nariz é a região mais afetada e os sinais respiratórios são comuns, a proximidade dos proprietários com os gatos doentes pode proporcionar a infecção nas mucosas (SCHUBACH, 2005; GREMIÃO 2014; OROFINO-COSTA et al., 2017; YAMAGATA et al., 2017).

Há também a forma cutânea disseminada e a extracutânea, observadas em pacientes imunossuprimidos (FREITAS et al., 2012; 2014; SILVA et al., 2013). A forma cutânea disseminada é caracterizada por múltiplas lesões cutâneas em locais não contíguos e já foi relatada também em pacientes imunocompetentes, ocasionada por múltiplas inoculações, relacionada com a transmissão zoonótica pelo gato (BARROS et al., 2003; BARROS, 2011; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011; OROFINO-COSTA et al., 2017). A esporotricose extracutânea é rara e de difícil diagnóstico, ocorre após a disseminação hematogênica, está relacionada à pacientes com aids, diabetes, alcoolismo crônico, pacientes que fazem uso prolongado de esteróides e com doença pulmonar obstrutiva crônica e o sistema osteoarticular é o mais acometido. Existem relatos de casos de esporotricose pulmonar primária, que ocorrem devido à inalação do fungo e a apresentação clínica é semelhante à da tuberculose (SINGHAI et al., 2012; OROFINO-COSTA et al. 2013). A meningite associada à infecção por *Sporothrix* spp. também foram descritas principalmente nas duas últimas décadas (XAVIER et al., 2013; FREITAS et al., 2015).

O diagnóstico da esporotricose é realizado correlacionando os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, sendo confirmado pelo isolamento e identificação de *Sporothrix* spp., a partir de espécimes clínicos, metodologia esta obrigatória no diagnóstico laboratorial e considerado teste padrão ouro (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011).

1.3.1 Agente etiológico

A maioria das 51 espécies incluídas no gênero *Sporothrix* são fungos ambientais não patogênicos e estão associados ao solo, a madeira e plantas em decomposição (DE BEER, DUONG E WINGFIELD, 2016). São organismos eucarióticos, heterotróficos, sem mobilidade própria, com parede celular quitinosa e rígida. Pertencem ao Reino Fungi, ao Filo Ascomycota, a Classe Sordariomycetes, a Ordem Ophiostomatales e a Família Ophiostomataceae (GUARRO et al, 1999, MILLER e HUHNDORF, 2009).

A esporotricose é causada por alguns fungos dimórficos do gênero *Sporothrix*: *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. pallida* (anteriormente *S. albicans*), *S. mexicana*, *S. luriei* e *S. chilensis* (MARIMON et al., 2007, 2008; ROMEO, SCORDINO e CRISEO, 2011; RODRIGUES et al., 2016). Dentre as espécies, quatro são de

grande interesse clínico: *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. mexicana* (MARIMON et al., 2007; MADRID et al., 2009; DIAS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES, HOOG e CAMARGO, 2013; YU et al., 2013; LIU, ZHANG e ZHOU, 2014; OTTONELLI-STOPIGLIA et al., 2014; CAMACHO et al. 2015; SUZUKI et al., 2016; NATH, LAHON e TIMUNG, 2017).

S. brasiliensis é a espécie de maior frequência nos casos de esporotricose no Brasil, também é a espécie relacionada à transmissão zoonótica por gatos domésticos, especialmente no Estado do Rio de Janeiro (MARIMON et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013, 2014; CHAKRABARTI et al, 2015; GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2015; RODRIGUES, DE HOOG e CAMARGO, 2016; GREMIÃO et al., 2017; BOECHAT et al., 2018).

1.3.2 Morfologia

Em vida saprobiótica ou quando cultivado entre 25°C a 30°C *Sporothrix* spp. apresenta-se em sua forma filamentosa, macroscopicamente, colônias de coloração branca a creme no início, podendo adquirir uma tonalidade que varia do marrom ao negro, após alguns dias. Microscopicamente constituem-se de hifas finas, septadas e hialinas de 1-2µm de largura, com conídios unicelulares podendo ser de dois tipos: hialinos e castanhos (demáceos). Os conídios hialinos são pequenos, ovóides, surgindo de forma blástica simpódial a partir de dentículos distintos na porção apical dos conidióforos, semelhantes a flores de margarida, característica do gênero *Sporothrix*. Já os conídios demáceos são grandes, ovóides, com parede celular espessa, sendo observados ao longo de toda a extensão das hifas, (ST-GERMAIN e SUMMERBELL, 1996). Os conídios não possuem a propriedade de formar cadeias (SIGLER et al, 1990).

Todas as espécies patogênicas de *Sporothrix* spp. são evidenciadas em parasitismo na forma leveduriforme ou quando cultivadas entre 35°C a 37°C em meios de cultivo enriquecidos (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011), como por exemplo ágar infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* - BHI) e ágar sangue, entre outros (Anvisa, 2013). Nessas condições, macroscopicamente as colônias leveduriformes são lisas de consistência cremosa, de cor bege a creme e microscopicamente, as células são redondas ou ovais, com 2 a 6 µm de diâmetro, apresentando geralmente brotamento alongado em forma de charuto. Portanto para a identificação definitiva dos

isolados de *Sporothrix* spp. em amostras clínicas ou ambientais deve se demonstrar o dimorfismo (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2011).

1.3.3 Filogenia

Durante muito tempo *S. schenckii* foi considerado um único táxon responsável por causar a esporotricose. Nos últimos anos, estudos moleculares utilizando diferentes métodos, como por exemplo, sequenciamento da região ITS (espaço de transcrição interna) do DNA ribossômico (rDNA), análise do DNA mitocondrial, polimorfismo de fragmentos de DNA gerados após digestão com enzimas de restrição (RFLP) de diferentes genes e a reação de polimerase em cadeia com sequências iniciadoras arbitrárias (RAPD) demonstraram a existência de variações genéticas entre os isolados pertencentes a essa espécie (ISHIZAKI et al., 1998, 2000; MESA-ARANGO et al., 2002; WATANABE et al., 2004; NEYRA et al., 2005).

Um estudo de Marimon e colaboradores (2006) analisando sequências de DNA de três regiões nucleares, quitina sintase, β -tubulina e calmodulina, revelou três grupos principais, um contendo todos os isolados europeus, outro apenas com os isolados brasileiros e o terceiro com isolados de outros países sul-americanos e da África.

Em 2007, Marimon e colaboradores demonstraram que *S. schenckii* não deveria ser considerada uma única espécie causadora da esporotricose, já que por meio de análises fenotípicas e genotípicas, foram descritas três novas espécies, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*, além das espécies já descritas *S. schenckii*, espécie considerada patogênica e *S. albicans*, associada às amostras ambientais. Nesse estudo foi proposta uma chave de identificação taxonômica, cujo os dados estão presentes na tabela 2, baseada em provas fenotípicas que variam entre as espécies de *Sporothrix*. Análise da morfologia dos conídios em meio *Corn Meal Agar* (CMA) incubados a 30°C por 10 a 12 dias, teste do diâmetro da colônia em meio PDA a 30°C, termotolerância a 37°C incubados por 21 dias e teste de assimilação de carboidrato utilizando sacarose e rafinose (MARIMON et al., 2007). O mesmo estudo propôs a caracterização genotípica das espécies pelo sequenciamento parcial do gene codificador da calmodulina.

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa sugeriu que *S. schenckii* var. *luriei* deveria ser considerada uma nova espécie, denominada *S. luriei*, com base no método polifásico do estudo anterior (MARIMON et al., 2008).

Tabela 2. Chave de identificação taxonômica para as espécies do complexo *Sporothrix*

Espécie	Conídio sésil e demáceo	Diâmetro da colônia >50mm em PDA a 30°C após 21 dias	Termotolerância a 37°C	Assimilação de açúcares	
				Sacarose	Rafinose
<i>S. pallida</i>	Não	Sim	Sim	+	-
<i>S. brasiliensis</i>	Sim	Não	Sim	-	-
<i>S. globosa</i>	Sim	Não	Não	+	-
<i>S. mexicana</i>	Sim	Sim	Sim	+	+
<i>S. schenckii</i>	Sim	Não	Sim	+	+
<i>S. luriei</i>	Não	Sim	Sim	-	-

Fonte: Oliveira, 2013, adaptado de Marimon et al., 2007.

Análise filogenética do rDNA e do sequenciamento parcial do gene codificador da β -tubulina em conjunto com análise morfológica revelaram semelhança significativa entre as espécies de *S. pallida*, *S. albicans* e *S. nivea*, portanto deveriam ser considerados sinônimos de *S. pallida*, a primeira das três espécies a ser descrita. E a análise do gene da β -tubulina revelou ser um bom marcador molecular para identificar as espécies ambientais de *Sporothrix* spp. (DE MEYER et al., 2008).

Recentemente foi descrita uma nova espécie, *S. chilensis*, relacionada a amostras ambientais do Chile, a qual foi isolada da unha de uma paciente com onicomicose e do solo do jardim da paciente. Um modelo murino de infecção experimental com o isolado clínico permitiu o desenvolvimento de esporotricose disseminada com invasão pulmonar revelando o potencial patogênico da espécie *S. chilensis* (RODRIGUES et al., 2016). Segundo RODRIGUES e colaboradores (2016), *S. chilensis* apresenta características morfológicas semelhantes às espécies *S. mexicana* e *S. pallida*.

A forma sexuada de *S. schenckii* até o momento não foi descrita. Análises moleculares da região 18S do DNA ribossomal mostraram inicialmente que *S. schenckii* encontrava-se filogeneticamente dentro do gênero *Ophiostoma* e que a

forma sexuada desse fungo seria *Ophiostoma stenoceras* (BERBEE e TAYLOR, 1992). Hintz (1999) avaliando os genes da quitina sintase reforçou que a forma teleomórfica do patógeno *S. schenckii* pertence ao gênero *Ophiostoma*. No entanto, outros autores demonstram diferenças morfo-fisiológicas entre as duas espécies (DIXON et al, 1991; O'REILLY e ALTMAN, 2006). Recentemente foi realizado um estudo analisando sequencias de DNA de três genes, calmodulina, β -tubulina e a região ITS, com intuito de resolver a relação filogenética entre *Ophiostoma* e *Sporothrix* e os resultados apontaram que o gênero *Sporothrix* é uma linhagem monofilética distinta de *O. stenoceras* (DE BEER, DUONG e WINGFIELD, 2016).

1.3.4 Identificação de *Sporothrix* spp.

A identificação dos isolados de *Sporothrix* em nível de espécie, apenas pela caracterização fenotípica pode ser inconclusiva, devido a variações intraespecíficas. Um estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2011) com 247 isolados provenientes da hiperendemia do Rio de Janeiro, obtidos entre os anos de 1998 a 2008, demonstrou que 25 desses isolados não foram identificados utilizando apenas os métodos fenotípicos, sendo caracterizados somente em nível de gênero. Posteriormente outros autores também relatam a inconclusividade ou ambiguidade da identificação fenotípica em isolados de *Sporothrix* spp. (RODRIGUES et al., 2013; OTTONELLI STOPIGLIA et al., 2014; CAMACHO et al., 2015; MAHMOUDI et al., 2016; NATH, LAHON ETIMUNG, 2017). A chave taxonômica proposta por Marimon e colaboradores (2007) auxilia na caracterização dos isolados de *Sporothrix* spp., porém, a identificação definitiva das espécies de *Sporothrix* deve ser associada a análises genotípicas (OLIVEIRA et al., 2011; 2012; RODRIGUES et al., 2013; CAMACHO et al., 2015).

Rodrigues e colaboradores. (2014) propuseram utilizar a PCR-RFLP como um método alternativo para identificar as espécies de *Sporothrix* spp. de interesse clínico, no entanto essa técnica não foi capaz de identificar as espécies consideradas ambientais, *S. pallida* e *S. mexicana*, que também podem causar esporotricose. Já Oliveira e colaboradores (2012) descreveram um método simples, rápido e menos dispendioso, por meio de uma PCR *fingerprinting*, baseada na região dos espaçadores intergênicos dos genes do RNA transportador (tRNA) utilizando o primer universal T3B. Essa técnica foi suficiente para identificar os isolados clínicos das

principais espécies patogênicas de *Sporothrix* spp. (OLIVEIRA et al., 2012). E um estudo posterior foi aplicada para distinguir as espécies clínicas e ambientais, na qual gerou padrões de bandas claramente distintos para cada espécie, apresentando 100% de concordância com o sequenciamento parcial do gene da calmodulina, sendo uma alternativa ao sequenciamento, permitindo a identificação tanto de isolados clínicos quanto ambientais (OLIVEIRA et al., 2015a). Embora variações intraespecíficas possam ser observadas, como encontrada nas cepas de *S. brasiliensis*, no entanto não alterou a identificação dessa espécie, sendo observada semelhanças superiores a 80% no perfil de bandas (OLIVEIRA et al. 2012; 2015a).

Em outro estudo, Oliveira e colaboradores (2015b) utilizaram a espectrometria de massa, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), demonstrando a capacidade de identificar claramente os isolados de *Sporothrix* spp.. Além do processo de preparo e análise ser mais rápido, pode ser aplicado na identificação de fungos de origem clínica ou ambiental, tendo também a possibilidade de ser uma metodologia robusta para ser aplicada em coleções de culturas na identificação ou reclassificação de isolados depositados (LIMA-NETO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

Outros métodos de identificação também foram desenvolvidos, podendo ser aplicados para o diagnóstico da esporotricose, como sugerido por Rodrigues e colaboradores (2015a), no qual desenvolveram novos marcadores moleculares para o gene da calmodulina, específicos para as principais espécies de interesse clínico, *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. pallida*. O mesmo grupo de pesquisa propôs utilizar a técnica *Rolling Circle Amplification* (RCA) para identificação específica das espécies de *Sporothrix*, por meio do desenvolvimento de seis sondas direcionadas para polimorfismos no gene codificador da calmodulina. Essa técnica foi capaz de diferenciar a maioria das espécies patogênicas de *Sporothrix*, *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* e *S. pallida* (RODRIGUES et al. 2015b). A vantagem dessa técnica em relação a uma PCR convencional está na condição em que é realizada, chamada de reação isotérmica, que ocorre à temperatura ambiente, dessa forma não necessita de equipamentos como termocicladores para sua realização. Além disso, apresenta alta especificidade e sensibilidade, sendo capaz de detectar as sequências do DNA alvo em baixas concentrações (GOO e KIM 2016).

O desenvolvimento de novos métodos de identificação rápidos e confiáveis são importantes para possibilitar uma melhor vigilância epidemiológica da esporotricose.

1.3.5 Fatores de virulência

A sobrevivência de agentes patogênicos no hospedeiro é essencial para o estabelecimento inicial de uma infecção. Vários fatores de virulência responsáveis pela sobrevivência de microrganismos têm sido descritos, como, a parede celular, produção de enzimas responsáveis pela adesão aos tecidos dos hospedeiros, fosfolipases, proteases e elastases capazes de causar dano tecidual, escape do sistema imune. Produção de pigmentos, cápsula, biofilme ou a capacidade de sobreviver no meio intracelular, transição morfológica de acordo com o ambiente em que se encontra, termotolerância a 37°C, capacidade de crescer no hospedeiro humano e em outros mamíferos (HOGAN, KLEIN e LEVITZ, 1996; BRUNKE et al., 2016).

Os fatores de virulência das espécies de *Sporothrix* ainda são pouco conhecidos, com escassas publicações científicas sobre o assunto. Um dos principais fatores de virulência associado às espécies de *Sporothrix*, assim como de outros fungos patogênicos, é a termotolerância. Outro importante fator de virulência para muitos fungos patogênicos é a melanina. A presença desse pigmento na parede celular pode aumentar a resistência dos fungos a estresses ambientais, protegendo-os de enzimas hidrolíticas, da radiação ultravioleta, de temperaturas extremas e conferir maior resistência à fagocitose por espécies de amebas e nemátodeos encontrados no ambiente (TABORDA et al., 2008). A melanina também confere resistência à fagocitose por macrófagos e também pode tornar o fungo menos suscetível a fármacos (DA SILVA et al., 2006). Tanto a forma filamentosa, quanto a leveduriforme de *Sporothrix* spp. são capazes de produzir pelo menos um dos três tipos de melanina, DHN-melanina, eumelanina ou piomelanina (ALMEIDA-PAES et al., 2017).

Romero-Martinez colaboradores (2000) demonstraram em um estudo que a melanina protege *Sporothrix* spp., contra agentes oxidativos e contra a fagocitose. As células melanizadas foram menos suscetíveis à morte por radicais derivados de oxigênio e nitrogênio do que as células com deficiência de melanina. Além disso, os conídios melanizados também foram mais resistentes à fagocitose e à morte por monócitos humanos e macrófagos de murinos do que os conídios não melanizados, o que favoreceria a instalação da infecção, em virtude de essas serem as partículas infectantes do fungo. Além dessa proteção, estudos recentes demonstraram que a

melanina exerce um potencial papel protetor nas principais espécies patogênicas, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, contra os efeitos antifúngicos da terbinafina e da anfotericina B (ALMEIDA-PAES et al., 2016; MARIO et al., 2016).

Contudo, os aspectos fenotípicos relacionados à virulência como a melanização, termotolerância e produção de proteases, catalase e uréase são expressos de maneira variável entre as espécies de *Sporothrix* e podem estar relacionadas com as diferentes formas clínicas da esporotricose (ALMEIDA-PAES et al., 2015). Almeida-Paes e colaboradores (2014) estudando alguns isolados de *Sporothrix* spp. provenientes da epidemia do Estado do Rio de Janeiro, observaram manifestações clínicas distintas da esporotricose e diferentes respostas terapêuticas, comparando pacientes com esporotricose causada por *S. schenckii* com aqueles que tiveram esporotricose por *S. brasiliensis*. Os isolados de *S. brasiliensis* foram associados à infecção cutânea disseminada, enquanto *S. schenckii* causaram doença menos grave e mais frequentemente localizada.

O quadro imunológico do hospedeiro também é um fator determinante para o tipo de manifestação clínica da doença. Gutierrez-Galhardo e colaboradores (2008), sugeriam que as diferentes formas clínicas podem estar correlacionadas à condição imunológica do paciente, dado que não foi observado correlação com os padrões genotípicos e as manifestações clínicas específicas da esporotricose, nos casos avaliados nesse estudo. Entretanto tem sido sugerido que variações genéticas entre isolados fúngicos, bem como novas espécies fúngicas de interesse clínico poderiam influenciar no desenvolvimento clínico de diversas micoses entre estas, a esporotricose, sendo importante uma análise ampla tanto dos aspectos intrínsecos ao patógeno quanto ao hospedeiro (ALMEIDA-PAES et al. 2014; CAMACHO et al. 2015; LOCKHART et al. 2017).

Alterações no gene codificador da enzima quitina sintase foram observadas em isolados de *S. brasiliensis* de um mesmo paciente, o qual desenvolveu esporotricose disseminada de evolução crônica, apresentando um histórico de seis anos de lesão cutânea. Cinco isolados foram obtidos em diferentes períodos ao longo da evolução clínica, sendo todos identificados como *S. brasiliensis* pelos genes que codificam a β -tubulina e a quitina sintase, e também apresentaram o mesmo perfil genotípico pela PCR *fingerprinting* com o marcador molecular T3B, compatível com a cepa controle de *S. brasiliensis*. Entretanto, diferenças no gene da quitina sintase foram observadas no quinto isolado, o mais virulento em modelo de infecção em *Galleria mellonella*, o

qual apresentou um polimorfismo em dois pares de bases, comparando-o com os quatro primeiros isolados (FREITAS et al., 2015).

A quitina é um componente essencial da parede celular e dos septos das células fúngicas e está presente em todos os fungos patogênicos (LENARDON, MUNRO e GOW, 2010). A parede celular protege a célula de fungos de lesões externas, regula a adesão das células hospedeiras aos componentes da parede celular. Mudanças na estrutura da parede celular, bem como na sua composição, podem afetar a virulência fúngica (BULAWA et al., 1995). Portanto sugere-se que o polimorfismo no gene codificador da quitina sintase possivelmente afetou a síntese de quitina e a estrutura da parede celular, conseqüentemente alterou a virulência do fungo (FREITAS et al., 2015).

Em modelo murino as espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii* são consideradas as mais virulentas, principalmente *S. brasiliensis*. Essas espécies são capazes de causar mortalidade em modelo experimental e de realizar disseminação para vários órgãos, enquanto *S. globosa* é descrita com uma espécie menos virulenta (ARRILLAGA-MONCRIEFF, 2009; DELLATERRA et al., 2017). No entanto, Della Terra e colaboradores (2017) descreveram que variações intraespecíficas também podem influenciar na heterogeneidade dos níveis de virulência. Foi observado que diferentes isolados de *S. brasiliensis* podem ser classificados tanto como alta, média ou baixa virulência, demonstrando que a virulência é cepa-específica. E também que a capacidade de disseminação está relacionado à via de infecção, uma vez que os mesmo isolados de *S. brasiliensis* anteriormente classificados como virulentos em um modelo sistêmico de infecção em murino, o qual foi infectado com conídios por inoculação intravenosa, apresentaram menor capacidade de disseminação quando submetido a uma via subcutânea, que é a via natural de transmissão da esporotricose (DELLATERRA et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Nosso grupo de pesquisa tem se direcionado para a caracterização de *Sporothrix* spp., oriundos da área hiperendêmica do Estado do Rio de Janeiro (GUTIERREZ GALHARDO et al., 2008; REIS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; ALMEIDA-PAES et al., 2014; 2015; BOECHAT et al., 2018). Os estudos de taxonomia polifásica têm permitido e permitirão esclarecer aspectos ainda desconhecidos sobre os isolados de *Sporothrix* spp. (OLIVEIRA et al., 2011; 2012; 2015; RODRIGUES, DE HOOG e DE CAMARGO, 2013; OTTONELLI STOPIGLIA et al., 2014; CAMACHO et al., 2015; MAHMOUDI et al., 2016; SUZUKI et al., 2016). Conseqüentemente, a avaliação dos métodos de preservação para esses isolados, que garantam a estabilidade fenotípica e genotípica, além de proporcionar maior segurança no armazenamento das cepas e a sua utilização em estudos futuros, serão importantes. Em virtude de já ter sido descrito na literatura que o armazenamento pode alterar as características morfológicas, fisiológicas e os fatores de virulência de algumas espécies fúngicas (DA SILVA, BORBA e DE OLIVEIRA, 1994; BORBA e SCHÄFFER, 2002; LIMA, SCHÄFFER e BORBA, 2003; 2004; MENDOZA et al., 2005; BORMAN et al., 2006; APARECIDO e CAMILO, 2013; FREIRE et al., 2016; KARABIÇAK, KARATUNA e AKYAR, 2016).

Ressalta-se que uma variedade de métodos de preservação que podem ser utilizados em microrganismos, no entanto, podem apresentar resultados distintos quanto à viabilidade, estabilidade fenotípica e genotípica conforme a espécie a ser preservada e devem ser selecionados também de acordo com a infraestrutura disponível pelo laboratório (FIGUEIREDO, 2001; SMITH, RYAN e DAY, 2001; WFCC, 2010; OCDE, 2012; HOFLING e GONÇALVES, 2016). Dessa forma torna-se importante os estudos e aprimoramento dos métodos utilizados para preservação dos microrganismos a longo prazo.

Atualmente são escassos os dados da estabilidade dos perfis fenotípicos, genotípicos e proteômicos de isolados de *Sporothrix* spp., após o armazenamento. Apesar de alguns estudos realizados com a preservação de *Sporothrix* spp. terem demonstrado 100% de viabilidade e preservado as características macro e micromorfológicas (BORBA et al., 1992; DE CAPRILES et al., 1993; MENDOZA et al., 2005). Não foi descrito se a identificação das espécies por características fenotípicas e genotípicas pode ser comprometida, após o armazenamento. Uma vez que muitos

estudos taxonômicos e epidemiológicos utilizam cepas armazenadas em coleções de culturas. Portanto é necessário realizar a identificação correta e o armazenamento desses fungos por longos períodos de modo a garantir a viabilidade e as mesmas características da cultura original. Ressalta que para realizar a identificação das espécies de *Sporothrix* spp. é necessário o uso de técnicas moleculares, as quais não estão disponíveis em todos os laboratórios clínicos. Sendo importante utilizar métodos de preservação mais acessíveis nesses laboratórios que permitam a estabilidade das características fenotípicas e genotípicas do fungo até o envio a laboratórios de referência ou coleções de culturas para sua identificação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a estabilidade do padrão fenotípico e genotípico dos isolados de *Sporothrix* spp. caracterizados por taxonomia polifásica após preservação em diferentes métodos de armazenamento.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar a viabilidade dos isolados de *Sporothrix* spp. após 6, 12, 18 e 24 meses de preservação;

3.2.2 Avaliar e correlacionar os perfis fenotípicos dos isolados de *Sporothrix* spp. no momento do isolamento e após 6,12, 18 e 24 meses de preservação;

3.2.3 Avaliar e correlacionar os perfis genotípicos dos isolados de *Sporothrix* spp. no momento do isolamento e após 24 meses de preservação;

3.2.4 Avaliar o perfil proteômico dos isolados de *Sporothrix* spp. após 24 meses de preservação;

3.2.5 Avaliar a efetividade dos diferentes métodos de preservação para isolados de *Sporothrix* spp. e sugerir o método mais adequado para preservação desses isolados.

4 MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Na avaliação dos métodos de preservação, assim como para a identificação por taxonomia polifásica das espécies de *Sporothrix*, foram utilizados oito isolados de pacientes com esporotricose confirmada (IPEC 47514, IPEC 47535, IPEC 47547, IPEC 47550, IPEC 47551, IPEC 47553, IPEC 47557, 47559), associados à epidemia do Estado do Rio de Janeiro. Diagnosticados no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fiocruz. Os isolados foram armazenados na Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) [CMRVS 40421, CMRVS 40423, CMRVS 40424, CMRVS 40425, CMRVS 40426, CMRVS 40433, CMRVS 40427, CMRVS 40428].

As cepas de *S. schenckii* ATCC 16345 (OLIVEIRA et al., 2015a), *S. brasiliensis* CBS 120339 (MARIMON et al., 2007), *S. globosa* IPEC 27135 (OLIVEIRA et al., 2010) e *S. mexicana* MUM 11.02 (DIAS et al., 2011), armazenadas no acervo do Laboratório de Micologia do INI / Fiocruz, foram utilizadas, como controles das diferentes espécies de *Sporothrix* spp. na identificação molecular pela PCR *fingerprinting*.

4.2 Re-isolamento das Cepas Controles

Atualmente as cepas controles de *Sporothrix* spp. são mantidas pelos métodos de preservação (óleo mineral, água destilada, liofilização e sob refrigeração a 4°C). Para o re-isolamento das cepas controles, essas foram recuperadas inoculando um fragmento da colônia em meio PDA (Difco, França). Para a ressuspensão das cepas liofilizadas, o líofilo foi hidratado com 0,3mL de água destilada, homogeneizado e deixado em repouso por 30 minutos para hidratação da cepa, após a re-hidratação, foi reinoculado em meio PDA a 30°C por 14 dias (SMITH, RYAN e DAY, 2001; ATCC 2013).

4.3 Caracterização dos Isolados por Taxonomia Polifásica

Os oito isolados clínicos utilizados no estudo foram identificados inicialmente em nível de gênero antes do armazenamento. Foi realizado o subcultivo dos isolados em meio PDA (Difco, França) incubados a 30°C por 14 dias, sendo avaliado o dimorfismo em meio BHI (Difco, França) a 37°C por sete dias e observado as características macro e micromorfológicas das colônias nas duas morfologias. Para a análise das características microscópicas foram confeccionadas lâminas, coradas com lactofenol azul de algodão e analisadas ao microscópio óptico com aumento de 400x, tanto para fase filamentosa quanto para a fase leveduriforme de *Sporothrix* spp..

A caracterização fenotípica em nível de espécie foi realizada conforme descrito por Marimon e colaboradores (2007) e a identificação genotípica foi realizada pelo sequenciamento parcial dos genes constitutivos calmodulina e β -tubulina, e pela PCR *fingerprinting* utilizando o *primer* universal T3B (OLIVEIRA et al., 2012). A análise proteômica foi realizada pela espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) (OLIVEIRA et al., 2015b).

4.3.1 Provas de caracterização fenotípica dos isolados

A caracterização fenotípica segundo protocolo descrito por Marimon e colaboradores (2007, 2008) e adaptado por Oliveira e colaboradores (2011), seguiu as seguintes etapas.

4.3.1.1 Características morfológicas dos conídios

Os isolados de *Sporothrix* spp. cultivados em meio PDA foram transferidos para o meio de cultura *Corn Meal Agar* e incubados no escuro a 30°C durante 12 dias. Após o crescimento, preparou-se uma lâmina do fungo em sua fase filamentosa, utilizando lactofenol de Amann. As lâminas foram visualizadas ao microscópio óptico com aumento de 400x e observada às seguintes características dos conídios: cor (demáceo e ou hialino) e morfologia dos conídios (alongado, obvoidal, globoso e ou triangular), sendo realizada a leitura percorrendo todo o campo da lâmina por dois observadores (MARIMON et al. 2007).

4.3.1.2 Crescimento das colônias em meio PDA

Um fragmento de aproximadamente 1mm de diâmetro de cada colônia de *Sporothrix* spp., previamente cultivada em PDA, foi re-inoculado no centro de uma placa de Petri de 95 x 15mm contendo 25 mL do mesmo meio de cultura. Após 21 dias de incubação a 30°C foi realizada a medida do diâmetro das colônias, utilizando uma régua e mensurado a distância em milímetros entre as duas extremidades da colônia. O teste foi realizado três vezes em dias diferentes e calculado a média do diâmetro das colônias (MARIMON et al. 2007).

4.3.1.3 Termotolerância

Os isolados de *Sporothrix* spp. foram re-inoculados em placa de Petri contendo 5mL de meio PDA. Um fragmento de aproximadamente 1mm de diâmetro de cada colônia foi inoculado no centro das placas de Petri de 60 x 15mm, as quais foram incubadas por 21 dias a 37°C para verificar a capacidade de *Sporothrix* spp. de crescer a essa temperatura. Após o período de incubação realizou-se também a medida do diâmetro das colônias utilizando uma régua, sendo o teste realizado três vezes em dias diferentes e calculado a média do diâmetro das colônias (MARIMON et al. 2007).

4.3.1.4 Assimilação de Carboidratos

O teste foi realizado em placa de microtitulação de poliestireno com 96 poços, estéril com tampa, contendo meio de cultura YNB (*Yeas tNitrogen Base*) (Difco, França), acrescido de fontes de carboidrato a 10%. O carboidrato utilizado como controle positivo do teste foi a glicose, sendo os demais açúcares, sacarose e rafinose, utilizados para determinar o perfil de assimilação, possibilitando auxiliar na caracterização fenotípica das espécies de *Sporothrix*. E como controle negativo foi utilizado água destilada estéril, para o controle de qualidade da reação de assimilação foi utilizado isolado de *Rhodotorula* spp., selecionado por crescer na presença de todos os açúcares.

O preparo do inóculo foi realizado por meio da suspensão de conídios do fungo em sua fase filamentosa em 2mL de água destilada estéril e filtrada, 50µL da

suspensão foram aplicados em cada poço conforme figura 1, contendo de 2×10^5 até 2×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, o que corresponde a uma densidade óptica de 0,21 a 0,29, em comprimento de onda de 490 nanômetros. As placas foram então incubadas a 25°C por 10 dias, sendo realizada leitura visual, após 10 dias. O teste foi realizado três vezes em diferentes dias, tendo como critério de assimilação dos carboidratos baseado na presença ou na ausência de crescimento dos isolados de *Sporothrix* spp. (MARIMON et al. 2007; OLIVEIRA, 2011).

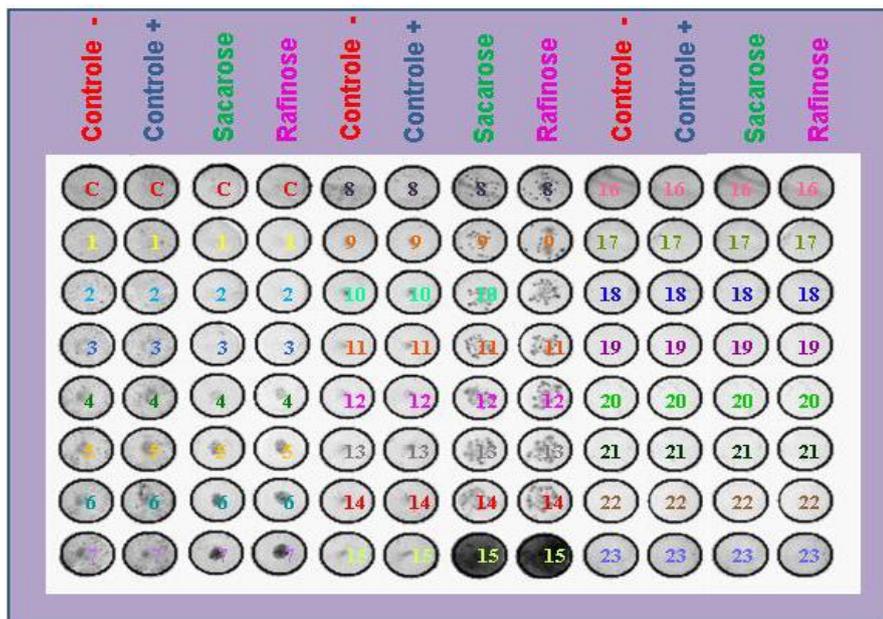


Figura 1. Esquema do teste de assimilação de carboidratos. Controle negativo (50µL YNB + 100 µL de H₂O + 50µL do inóculo). Controle positivo 50µL YNB + 100 µL de glicose + 50µL do inóculo. (C) Controle de qualidade da reação, isolado de *Rhodotorula* spp.. Fonte: Oliveira, 2009.

4.3.2 Métodos Moleculares

4.3.2.1 Extração de DNA

Técnicas convencionais utilizadas para a extração e purificação do DNA genômico de fungos filamentosos foram utilizadas de acordo com protocolos desenvolvidos previamente (OLIVEIRA et al., 2010). A extração de DNA foi realizada no tempo zero e após 24 meses de preservação seguindo as seguintes etapas:

a. Lise Mecânica: Nitrogênio líquido mais 600µL de tampão TES (Tris Etilenodiamino Tetracético 10mM, EDTA 50mM, Sacarose 20%);

- b. Precipitação de Proteínas: Clorofórmio Álcool Isoamílico (24:1), relação de 1:1 do solvente e do sobrenadante re-suspenso no processo;
- c. Precipitação DNA: Acetato de Sódio 3M 1/10 do volume total mais etanol absoluto 2,5x do volume total;
- d. Hidratação do DNA: 30µL de água destilada.

4.3.2.2 Sequenciamento

O sequenciamento parcial dos genes codificadores da calmodulina (*CAL*) e β -tubulina (*Bt2*) foi realizado com as seguintes seqüências iniciadoras [*primers*]: senso CL1 (5'-GA (GA) T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC-3') e *Bt2-F* (5'GG (CT) AACCA (AG) AT(ATC)GGTGC(CT)GC(CT)3') antisenso CL2A (5'-TTT TTGCATCATGAGTTGGAC-3') e *Bt2-R* (5'ACCCTC(AG)GTGT AGTGACCCTTGGC3) (O'DONNELL et al., 2000; MARIMON et al., 2006).

As condições da PCR utilizadas foram previamente descritas por Oliveira e colaboradores (2010; 2014), composta de 100ng de DNA, com o "mix" da PCR constituído de Buffer 10x PCR (Invitrogen, EUA), 2,0mM de MgCl₂ (Invitrogen, EUA), 0,04mM do mix de dNTPs (Invitrogen, EUA), 1U de *Taq* Platinum DNA polimerase (Invitrogen, EUA) e 10 µM de cada *primer* senso e antisenso. A reação ocorreu com desnaturação inicial do DNA obtida com aquecimento a 95°C por 10 minutos, sendo realizados 38 ciclos de desnaturação a 95°C por minuto, hibridização a 64,5°C por 50 segundos, extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A amplificação foi confirmada pela visualização dos *amplicons* após a eletroforese em gel de agarose a 1% (Agarose Ultra-Pure – Invitrogen, EUA) com TBE 0,5X (Tris 0,1M, ácido bórico 0,09M, EDTA 0,001 M, pH 8,4). Quatro microlitros do produto da PCR mais 2µL do tampão de corrida foram adicionados em cada poço do gel e a eletroforese foi conduzida a 90V por 60 minutos. As bandas de DNA foram coradas com submersão do gel em brometo de etídio, com 0,5 µg/mL por 30 minutos e posterior lavagem com água destilada por 30 minutos, analisado sob luz ultravioleta no Transiluminador – (HoeferScientific Inc). Após, o produto amplificado foi purificado com o *kit* de purificação (QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante, sendo o produto de DNA purificado ressuspenso em 30µL de água destilada. O sequenciamento foi realizado nas direções 5' e 3' em um volume de reação de 7,5µL contendo 4µL de *premix terminator*, 100 ng de DNA, 3,2 pM de *primer*

na de acordo com o método de Sanger e colaboradores (1977) na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

4.3.2.3 T3B PCR *fingerprinting*

Realizada com o marcador molecular T3B, as condições da PCR utilizadas foram as previamente descritas por Oliveira e colaboradores (2012), composta de 25ng de DNA e *mix* da PCR constituída de Buffer 10x PCR/KCl (Invitrogen, EUA), 0,2mM do *mix* de dNTPs (Invitrogen, EUA), 2,0mM de MgCl₂ (Invitrogen, EUA), 1U de *Taq* Platinum DNA polimerase (Invitrogen, EUA), 10µM do *primer* T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCGAATCC-3'). A reação ocorreu com desnaturação inicial do DNA obtida com aquecimento a 95°C por 10 minutos, sendo realizados 36 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 52°C por 30 segundos, extensão a 72°C por um minuto e 20 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

A amplificação foi confirmada pela visualização dos *amplicons* após a eletroforese em gel de agarose a 1,2%, (Agarose Ultra-Pure – Invitrogen, EUA) com TBE 0,5X (Tris 0,1M, ácido bórico 0,09M, EDTA 0,001 M, pH 8,4). Seis microlitros do produto da PCR mais 2µL do tampão de corrida foram adicionados em cada poço do gel, e a eletroforese foi conduzida a 60V por 90 minutos. As bandas de DNA foram coradas com brometo de etídio, 0,5 µg/mL por 30 minutos e posterior lavagem do gel em água destilada por 30 minutos, analisado sob luz ultravioleta no transiluminador – (HoferScientific Inc).

4.4 Métodos de Preservação

Foram avaliados três métodos para preservação de isolados fúngicos, sendo testados dois métodos para a fase filamentosa, preservação em água destilada, (método de Castellani) e sob refrigeração a 4°C, e um para a fase leveduriforme, o método de criopreservação a -80°C. Os isolados foram preservados durante dois anos nos três métodos e recuperados após 6, 12, 18 e 24 meses de armazenamento, para a avaliação da viabilidade e pureza dos mesmos, definida como a capacidade de crescimento sem a presença de contaminantes (LIMA e BORBA, 2001; BRILHANTE et al., 2015). Avaliação da estabilidade fenotípica por meio das características presentes na chave de identificação taxonômica (MARIMON et al., 2007) e avaliação

da estabilidade do dimorfismo. A estabilidade genotípica foi avaliada no final da preservação, sendo realizada a análise molecular no tempo zero e após 24 meses de armazenamento, por meio do sequenciamento parcial do gene codificador da β -tubulina. E a análise proteômica foi realizada após 24 meses de preservação pela espectrometria de massa (MALDI-TOF MS).

4.4.1 Preservação em água destilada

Na preservação em água destilada, conhecida como método de Castellani, foram utilizados frascos de vidro do tipo empregado para antibióticos com capacidade para 6mL, preenchidos com 4mL de água destilada estéril, autoclavados a 121°C sob 1 atm por 30 minutos. Um fragmento de 5mm x 10mm da colônia de *Sporothrix* spp. cultivada em meio PDA a 30°C por 14 dias, foi transferido para os frascos, sendo os mesmos vedados com rolha de borracha e parafilme e mantidos a temperatura ambiente controlada entre 20°C a 25°C (JOHNSO e MARTIN 1992; FIGUEIREDO, 2001). Após o período de armazenamento foram coletados 30 μ L da suspensão e re-inoculados em meio PDA inclinado e em ágar Mycosel inclinado, incubados a 30°C por 14 dias (QIANGQIANG e LI, 1998).

4.4.2 Preservação a 4°C

O método de preservação sob refrigeração a 4°C foi realizado utilizando um pequeno fragmento da colônia de *Sporothrix* spp., cultivadas anteriormente em meio PDA a 30°C por 14 dias, 1mm aproximadamente foi repicado em criotubo (Nunc) de 1,8mL estéril contendo 1mL de meio de cultura PDA inclinado, incubados a 30°C por sete dias. Após a incubação os frascos foram armazenados a 4°C. Transcorrido o tempo de preservação, pequenos fragmentos das colônias, 1mm aproximadamente foram retirados e inoculados em meio PDA inclinado, incubados a 30°C por 14 dias (FIGUEIREDO, 2001).

4.4.3 Criopreservação

Para o método de criopreservação foi utilizada a fase leveduriforme do fungo, cultivada em meio ágar BHI (Difco, França) a 37°C por sete dias. Foi transferida uma porção da cultura em alça de 10µL (10^6 células) para criotubo (Nunc) estéril de 1,8mL, contendo 1mL de caldo BHI (Difco, França) com glicerol 30%. Os criotubos foram armazenados inicialmente por um dia a -20°C e em seguida em freezer a -80°C. Após o armazenamento, os isolados foram recuperados em 50µL de suspensão, re-inoculados em meio ágar BHI inclinado e incubados a 37°C por sete dias. Posteriormente, as leveduras foram cultivadas em meio PDA inclinado a 30°C por 14 dias para obtenção da fase filamentosa e realização das provas fenotípicas e genotípicas (PASARELL e MCGINNIS, 1992).

4.5 MALDI-TOF MS

Foram transferidas 10^6 células leveduriformes de cada isolado (c.a. 1 mg) para tubos de 500µL contendo 20µL de ácido fórmico a 25% em água (v/v), em seguida foram submetidas ao vortex durante 20 segundos e mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos, após armazenadas a 4°C por 3 horas. Em seguida foi retirado 1mL do sobrenadante, transferido para uma superfície de película de parafina e misturado cuidadosamente a 2µL da solução matriz, contendo ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico (CHCA, Fluka, Buchs, Suíça) saturado numa solução com 33% de etanol, 33% de acetonitrilo, 31% de água e 3% de ácido trifluoroacético (TFA). Cada suspensão (1µL) foi aplicada em uma placa inoxidável MALDI-TOF MS (FlexiMass™, Shimadzu Biotech, Reino Unido) e analisadas no equipamento de espectrometria de massa, conforme esquema na figura 2.

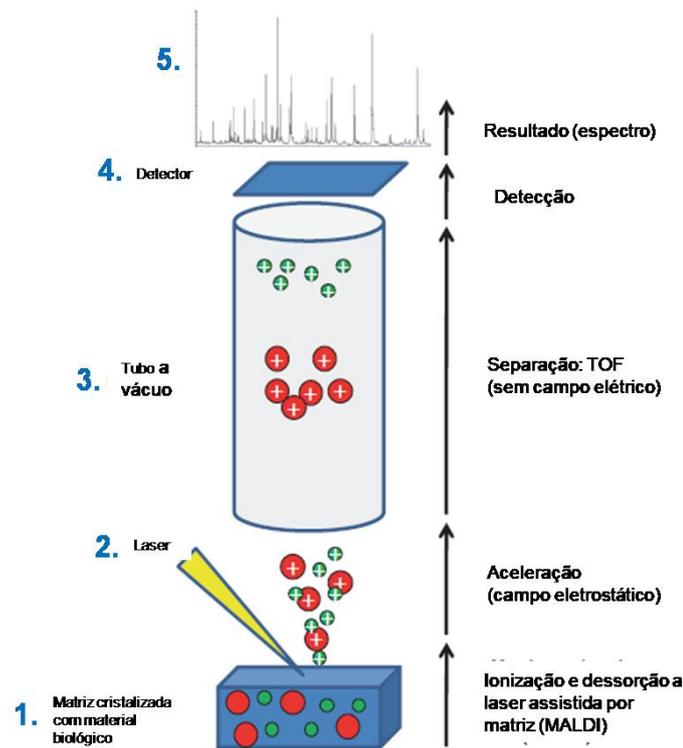


Figura 2. Descrição da técnica de MALDI-TOF MS. (1.) O material biológico é misturado a uma matriz polimérica e colocado em uma placa metálica condutora. (2.) Após a cristalização da matriz e do material biológico, a placa é introduzida no espectrômetro de massa e é bombardeada com um laser. (3. e 4.) O material vaporiza e ocorre a ionização de várias moléculas, que são aceleradas por um campo eletrostático e aspiradas num tubo a vácuo até chegarem a um detector, os íons menores viajam mais rápido do que íons maiores, com isso o tempo de chegada ao detector (*time of flight* - TOF) é diferente. (5.) As moléculas são separadas de acordo com o seu tempo de voo (TOF) gerando um espectro que é composto por picos de acordo com a relação massa/carga (m/z), o qual é comparado a um banco de dados. Fonte: adaptado de Croxatto, Prod'hom e Greub, 2012.

4.6 Análises dos Dados

A análise da estabilidade fenotípica foi realizada por meio da correlação dos dados obtidos das provas de caracterização fenotípica, segundo Marimon e colaboradores (2007) no tempo zero e após os diferentes tempos de preservação. Desse modo foi realizada a análise descritiva das variáveis, morfologia dos conídios e perfil de assimilação de carboidratos, por meio da descrição e comparação de contagens absolutas. Para comparar a mediana das variáveis quantitativas, diâmetros das colônias (a 30°C e a 37°C) de acordo com os grupos (t0, t6, t12, t18 e t24) foi realizado o teste não paramétrico de Friedman. Posteriormente, foi realizado o teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni para identificar as diferenças de cada grupo

em relação ao grupo padrão t0. A significância estatística foi definida com P-valor <0,05. Os testes estatísticos foram realizados no *software* R Core Team 2016.

As sequências dos genes constitutivos, calmodulina e β -tubulina, foram analisadas e editadas no programa Sequencher 4.9 (Genes Code Corporation) e comparadas pelo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - NIH) com sequências depositadas no NCBI GenBank (*Sporothrix* AM116899, AM117429, AM116908, AM398393, AM398396, AM747302, KP711816 e AM116914, AM116946, AM498343, AM747289, AM116966, AM498344, KP711814). Como grupo externo foi utilizada a espécie *Grosmannia serpens* (JN135300 e KF779138). O alinhamento das sequências e as análises filogenéticas foram realizados pelo *software* MEGA, versão 4.0, foi gerado um dendograma (árvore evolutiva baseada em similaridades) utilizando o método de *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987). A avaliação da significância da árvore foi realizada por meio do teste de confiança *Bootstrap* com 1.000 repetições (Felsenstein, 1985).

Para a análise da PCR *fingerprinting* foi utilizado análise visual comparativa dos perfis de bandas obtidas para os isolados do estudo com os perfis de bandas das cepas padrão das espécies de *Sporothrix* spp. conforme demonstrado por Oliveira e colaboradores (2012).

A avaliação proteômica após 24 meses de preservação foi realizada no *software* SARAMIS® (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnos Tec, Postdam-Golm, Alemanha) e para a construção da árvore filogenética foi utilizado o programa Bionumerics 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos Isolados por Taxonomia Polifásica

5.1.1 Morfologia

Na avaliação inicial, todos os isolados apresentaram características morfológicas compatíveis com as espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix*. Macroscopicamente na fase filamentosa as colônias apresentaram textura aveludada de cor inicialmente branca adquirindo uma coloração acastanhada ou negra (Figura 3A). O dimorfismo foi confirmado em todos os isolados, apresentando colônias com textura lisa de consistência cremosa de cor bege a creme (Figura 3B)



Figura 3. Macromorfologia de *Sporothrix* spp.. IPEC 47550. (A) Fase filamentosa em meio de cultura PDA a 30°C. (B) Fase leveduriforme de *Sporothrix* spp., em meio de cultura BHI a 37°C.

Microscopicamente os isolados apresentaram hifas finas, septadas e hialinas, com conídios hialinos e demáceos ao longo das hifas e ou na extremidade de conidióforos semelhante a “flores do tipo margarida”, característica do gênero *Sporothrix* na fase filamentosa (Figura 4A). Após a conversão em meio BHI A 37°C,

microscopicamente foram observadas estruturas leveduriformes variando do globoso a ovalado e brotamento alongado em forma de “charuto” (Figura 4B).

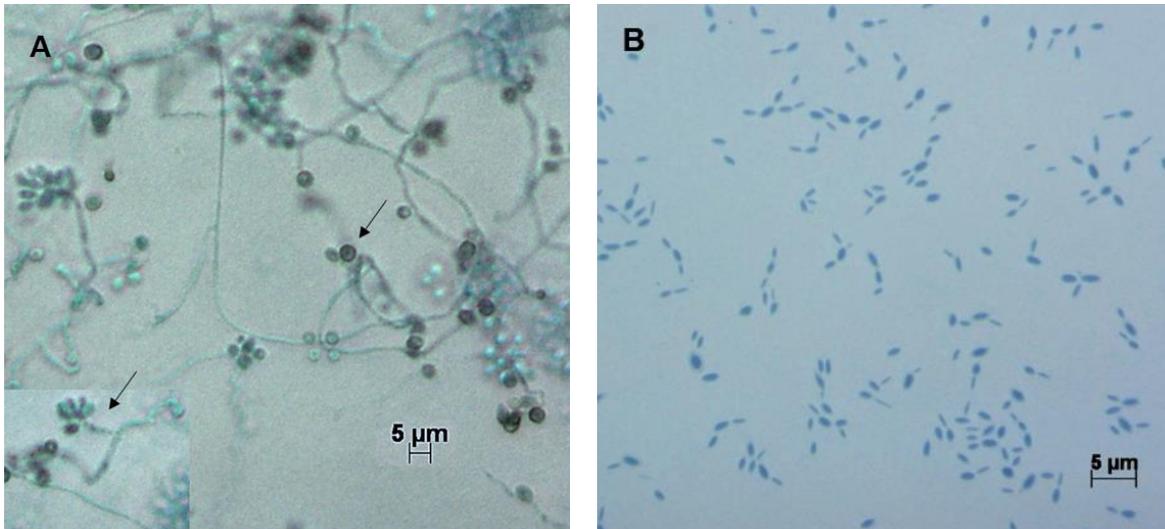


Figura 4. Micromorfologia de *Sporothrix* spp.. IPEC 47550. (A) Fase filamentosa em meio PDA a 30°C, conídios hialinos dispostos na extremidade de simpodial conidióforos semelhante a “margaridas”, corante azul de algodão aumento de 400x. (B). Fase leveduriforme em meio BHI a 37°C, células de levedura do tipo oval e brotamento alongado em forma de “charuto”, corante azul de algodão aumento de 400x.

5.1.2 Provas de caracterização fenotípica de isolados

Todos os isolados do estudo desenvolveram conídios hialinos e demáceos, com variável morfologia, desde obvoidal ou em forma de pera, até globoso e triangular. Apenas o isolado IPEC 47559 desenvolveu conídio pigmentado triangular (Figura 5).

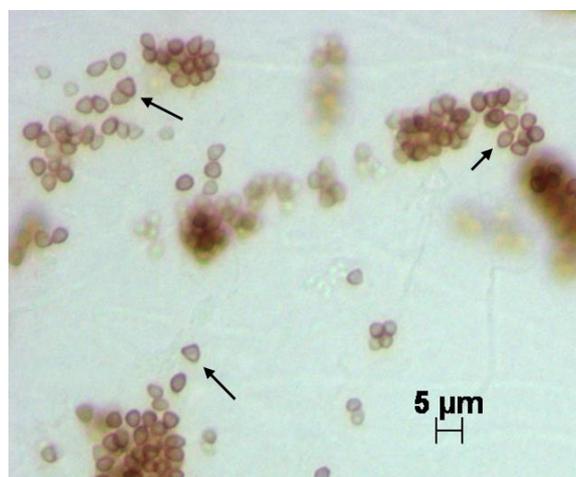


Figura 5. Conídio triangular. IPEC 47559. (A) Fase filamentosa em meio PDA a 30°C, aumento de 400x, corante lactofenol Amman.

O diâmetro das colônias em PDA variou de 22 a 63 mm após 21 dias de incubação a 30°C. Apenas um isolado, IPEC 47559, apresentou crescimento maior a 30°C, 63mm de diâmetro. O crescimento da colônia a 37°C foi menor, as colônias atingiram um diâmetro que variou de 6,50 a 11,50mm após 21 dias de incubação.

Quanto à assimilação dos carboidratos tanto o controle positivo quanto os isolados avaliados no estudo cresceram na presença da glicose e entre os oito isolados estudados, três não assimilaram a sacarose, e nenhum isolado cresceu na presença da rafinose, após 10 dias de incubação a 25°C.

De acordo com as características descritas na chave de identificação taxonômica, três isolados foram identificados como *S. brasiliensis* (IPEC 47514, IPEC 47535, IPEC 47550), apresentaram conídios hialinos e demáceos, diâmetro da colônia a 30°C menor do que 50mm após 21 dias de incubação, crescimento a 37°C e ausência de assimilação dos açúcares rafinose e sacarose. Os demais isolados não puderam ser identificados fenotipicamente (IPEC 47547, IPEC 47551, IPEC 47553, IPEC 47557, IPEC 47559), pois resultados inconclusivos segundo a chave de identificação taxonômica foram encontrados, sendo caracterizados como *Sporothrix* spp., antes de serem preservados (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação fenotípica antes do armazenamento

Isolados	Conídio sésil e demáceo	Diâmetro da colônia > 50mm em PDA a 30°C após 21 dias	Termotolerância a 37°C	Assimilação de açúcares		Caracterização fenotípica
				Sacarose	Rafinose	
IPEC 47514	Sim	não	Sim	-	-	<i>S.brasiliensis</i>
IPEC 47535	Sim	não	Sim	-	-	<i>S.brasiliensis</i>
IPEC 47547	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47550	Sim	não	Sim	-	-	<i>S.brasiliensis</i>
IPEC 47551	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47553	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47557	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47559	Sim	Sim	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.

IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil. (+) crescimento na presença do açúcar. (-) ausência de crescimento na presença do açúcar.

5.1.3 Métodos Moleculares

Os isolados foram identificados por meio do sequenciamento parcial dos genes codificadores da calmodulina e β -tubulina, com amplificação de fragmentos de aproximadamente 500 e 400 pares de base (pb) para os respectivos genes (Figuras 6 e 7).

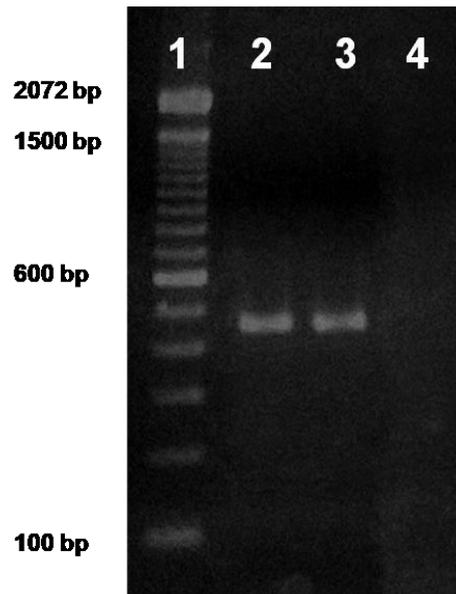


Figura 6. Imagem demonstrativa da amplificação parcial do gene da calmodulina. Gel de agarose a 1%. (1) Marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen, EUA). (2) IPEC 47514 *S. brasiliensis*. (3) IPEC 47535 *S. brasiliensis* tempo zero. (4). Controle negativo.

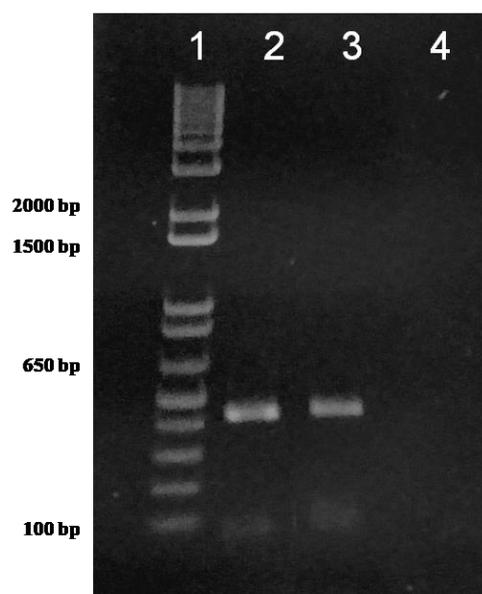


Figura 7. Imagem demonstrativa da amplificação parcial do gene da β -tubulina. Gel de agarose a 1%. (1) Marcador de peso molecular 1kb (Invitrogen, EUA). (2) IPEC 47514 *S. brasiliensis* preservado em água. (3) IPEC 47514 tempo zero. (4) Controle negativo.

Foi observada alta similaridade entre as sequências dos isolados desse estudo com as sequências depositadas no GenBank, 100% de similaridade com os isolados *S. brasiliensis* e 98% de similaridade com o isolado *S. schenckii* por meio da ferramenta BLAST. A árvore filogenética revelou dois distintos grupos, sete isolados avaliados no estudo agruparam-se com a cepa tipo de *S. brasiliensis* e um isolado IPEC 47559 apresentou similaridade com *S. schenckii*, (Figuras 8 e 9).

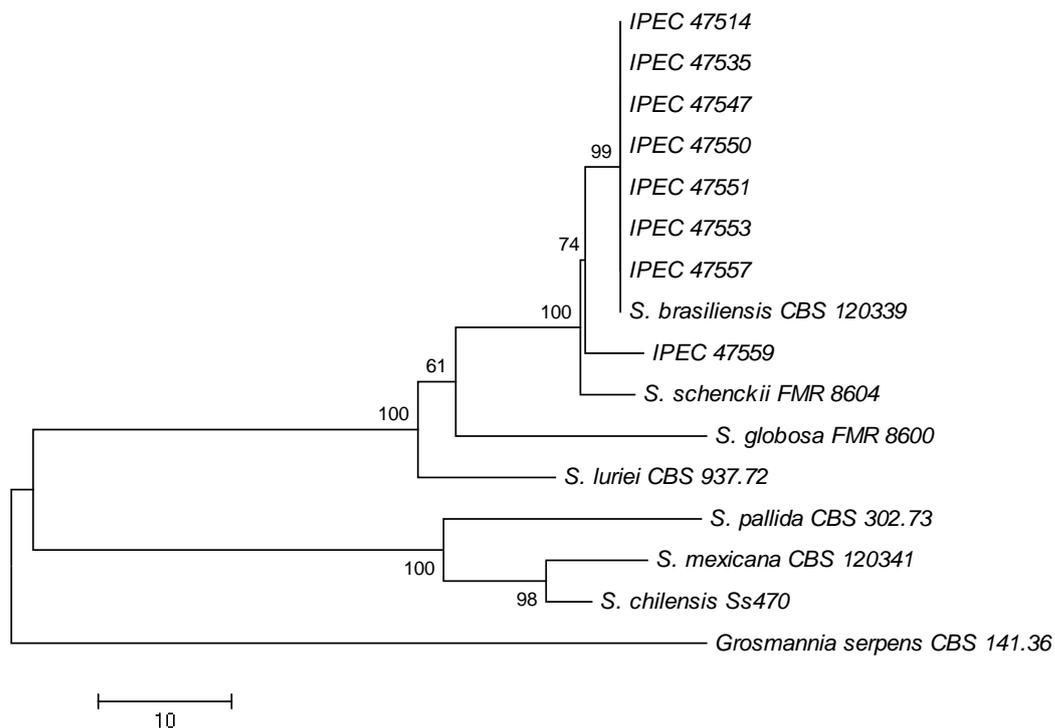


Figura 8. Árvore filogenética do gene parcial da calmodulina. Realizada para os oito isolados no tempo zero. Método de *Neighbor-Joining*. Significância verificada por meio do teste de confiança *Bootstrap* com 1.000 repetições indicado nos nós formados na árvore filogenética.

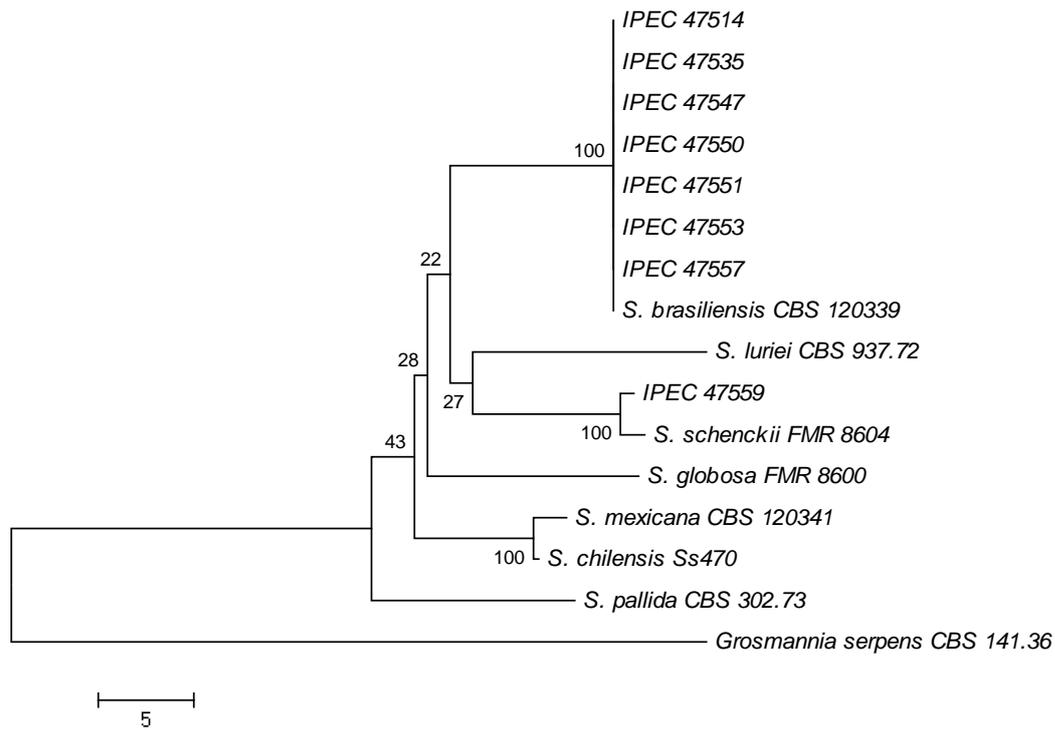


Figura 9. Árvore filogenética do gene parcial da β -tubulina. Realizada para os oito isolados no tempo zero. Método de *Neighbor-Joining*. Significância verificada por meio do teste de confiança *Bootstrap* com 1.000 repetições indicado nos nós formados na árvore filogenética.

Esses resultados também foram observados por meio da PCR *fingerprinting* com o *primer* T3B, os mesmos sete isolados foram identificados como *S. brasiliensis*, apresentaram perfil de bandas compatível com a espécie de *S. brasiliensis* e um isolado IPEC 47559 apresentou perfil de banda compatível com a espécie *S. schenckii* (Figura 10).

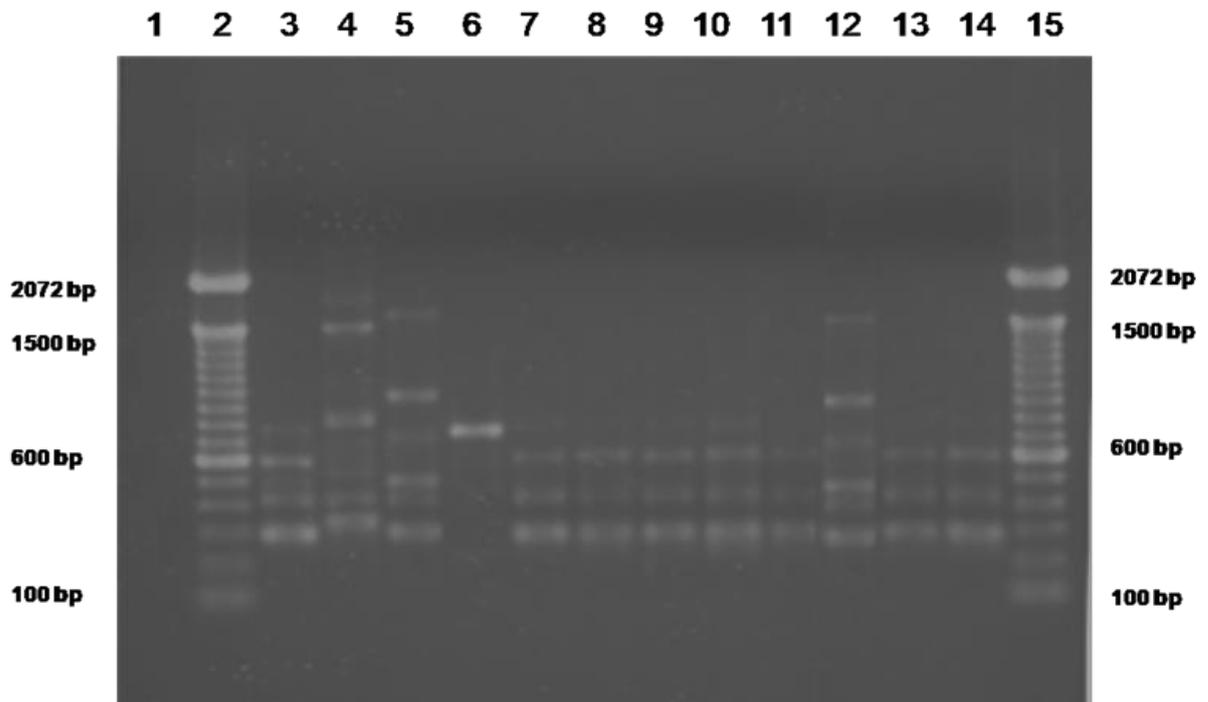


Figura 10. T3B PCR *fingerprinting* padrões das espécies do complexo *Sporothrix*: (1) Controle negativo. (2 e 15) Marcador molecular *ladder* 100bp (Invitrogen). (3 a 6) Controles positivos: (3) *S. brasiliensis* (CBS 120339), (4) *S. mexicana* (MUM 11.02), (5) *S. schenckii* (ATCC 16345), (6) *S. globosa* (IPEC 27135). (7 a 11, 13 e 14) *S. brasiliensis*. (12) *S. schenckii*.

5.2 Métodos de Preservação

5.2.1 Viabilidade e pureza

Todos os isolados foram recuperados durante todos os períodos avaliados com 6, 12, 18 e 24 meses de preservação, independente do método de armazenamento. Apesar da viabilidade demonstrada, o método de preservação em água destilada apresentou contaminações por fungos anemófilos, quando os isolados foram recuperados em meio PDA (tabela 4). Para recuperação desses isolados foi utilizado o meio Mycosel, o que possibilitou recuperar todos os isolados preservados em água destilada sem a presença de contaminantes. Já os isolados preservados sob refrigeração a 4°C e criopreservados a -80°C foram recuperados em todos os períodos, sem a presença de contaminações por outros fungos e ou bactérias.

Tabela 4. Contaminação após preservação em água destilada

Isolados	Tempo de armazenamento*			
	6M	12M	18M	24M
IPEC 47514	+	-	+	+
IPEC 47535	-	-	+	+
IPEC 47547	-	+	+	+
IPEC 47550	-	+	+	+
IPEC 47551	+	+	+	+
IPEC 47553	-	-	+	+
IPEC 47557	-	-	+	+
IPEC 47559	-	-	+	+

*Método de preservação em água destilada, com seis, doze, dezoito e vinte e quatro meses de armazenamento (6M, 12M, 18M e 24M), isolados recuperados em meio PDA a 30°C. IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil. (+) isolados com contaminantes, (-) isolados sem contaminantes.

5.2.2 Estabilidade Fenotípica

Após a recuperação dos isolados preservados nos três métodos, foi realizada a correlação dos dados obtidos das provas de caracterização fenotípica no tempo zero com os dados após o armazenamento. As características macro e micromorfológicas de todos os isolados foram consistentes após o armazenamento em água destilada e a 4°C. No entanto a análise macroscópica e microscópica revelou alterações após preservação a -80°C. Já o perfil de assimilação de carboidratos foi alterado após preservação em todos os métodos avaliados no estudo, essas alterações cujo dados estão resumidos na tabela 5 e são descritas a seguir.

Tabela 5. Alterações fenotípicas após 24 meses de preservação

Isolados	Conídio sésil e demáceo	Diâmetro da colônia > 50mm em PDA a 30°C após 21 dias	Termotolerância a 37°C	Assimilação de açúcares		Caracterização fenotípica
				Sacarose	Rafinose	
IPEC 47514	Sim	não	Sim	-	-	<i>S. brasiliensis</i>
H ₂ O	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
4°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
-80°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47535	Sim	não	Sim	-	-	<i>S. brasiliensis</i>
H ₂ O	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
4°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
-80°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47547	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
H ₂ O	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
4°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
-80°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47550	Sim	não	Sim	-	-	<i>S. brasiliensis</i>
H ₂ O	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
4°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
-80°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47551	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
H ₂ O	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
4°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
-80°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47553	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
H ₂ O	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
4°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
-80°C	não	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47557	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
H ₂ O	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
4°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
-80°C	Sim	não	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
IPEC 47559	Sim	Sim	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
H ₂ O	Sim	Sim	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
4°C	Sim	Sim	Sim	+	-	<i>Sporothrix</i> sp.
-80°C	Sim	Sim	Sim	+	+	<i>S. mexicana</i>

H₂O= preservação em água destilada. 4°C= preservação sob refrigeração a 4°C. -80°C= criopreservação a -80°C. IPEC (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil), isolados antes de serem preservados. (+) crescimento na presença do açúcar. (-) ausência de crescimento na presença do açúcar.

5.2.2.1 Características morfológicas dos conídios

A caracterização da morfologia dos conídios foi realizada re-inoculando os isolados de *Sporothrix* spp. em meio CMA e foram observadas alterações na morfologia, após o armazenamento. O isolado IPEC 47553 *S. brasiliensis*, antes de ser preservado a -80°C apresentava colônia castanha a marrom escuro, conídios hialinos e demáceos (Figura 11A e 11B). No entanto desenvolveu colônia sem pigmento e apenas conídios hialinos após o armazenamento a -80°C em todos os períodos avaliados (Figura 11C e 11D).

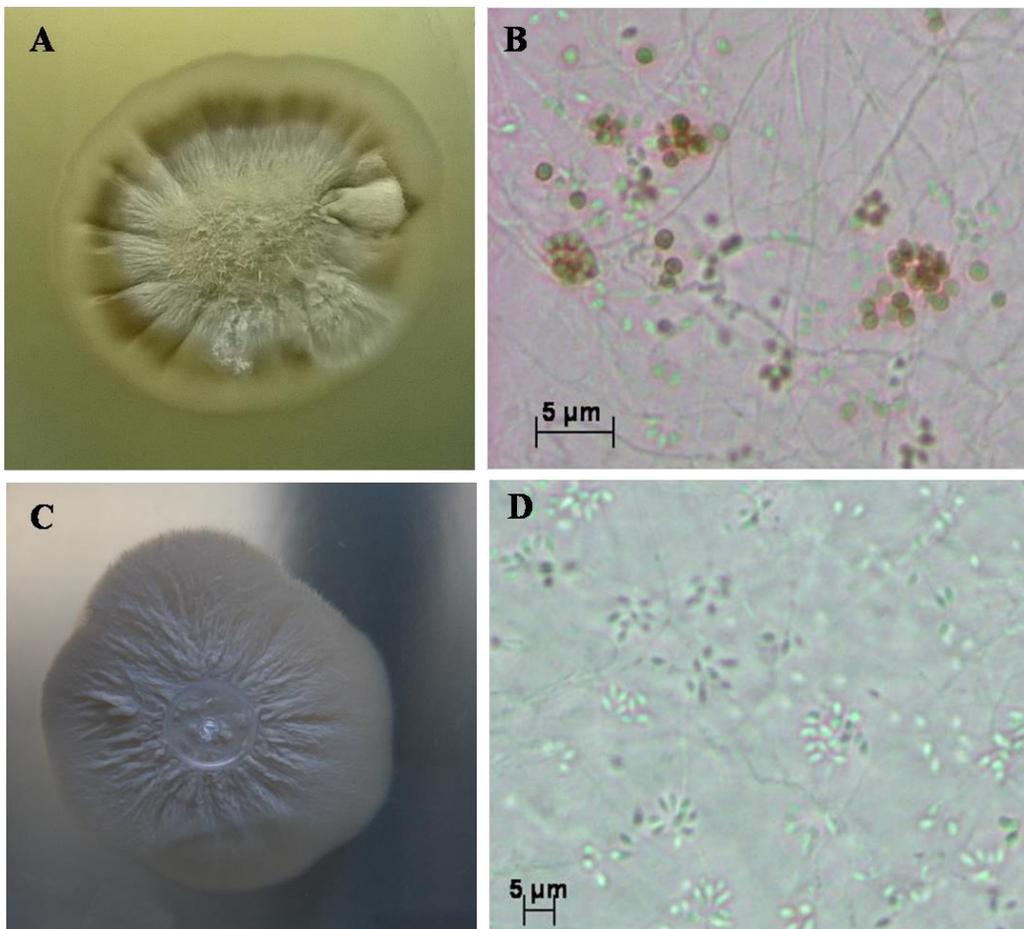


Figura 11. Diferenças morfológicas após criopreservação a -80°C . (A) IPEC 47553 *S. brasiliensis*, colônia no momento do isolamento (tempo zero) (B) IPEC 47553 micromorfologia no tempo zero, conídios demáceos e hialinos, alongados e globosos. (C) IPEC 47553 colônia após 24 meses de preservação a -80°C . (D) IPEC 47553 micromorfologia após 24 meses de preservação a -80°C , conídios hialinos e alongados.

5.2.2.2 Crescimento das colônias em meio PDA termotolerância e dimorfismo

A análise estatística realizada não apresentou diferença significativa na avaliação do diâmetro das colônias, após os isolados serem preservados nos três métodos, utilizando como valor a mediana (tabela 6). Correlacionando os valores obtidos antes e após o armazenamento no diâmetro das colônias com a chave taxonômica proposta por Marimon e colaboradores (2007), mesmo não havendo diferenças estatisticamente significativas, a alteração no tamanho da colônia, poderia ocasionar um erro de identificação. No entanto também não foram observadas diferenças no diâmetro das colônias que comprometessem a identificação pela chave após o armazenamento. O isolado IPEC 47559 *S. schenckii*, antes de ser preservado apresentava diâmetro da colônia maior do que 50mm a 30°C, sendo mantida essa característica após o armazenamento nos três métodos avaliados no estudo. E os demais isolados não apresentaram diâmetro da colônia maior do que 50mm antes e após a preservação.

No teste de termotolerância a 37°C, todos os isolados crescerem a essa temperatura antes e a após o armazenamento, não sofrendo alterações significativas no diâmetro das colônias (tabela 6). A preservação a 4°C apresentou melhor estabilidade por até seis meses de armazenamento, os diâmetros das colônias foram constantes em ambas as temperaturas de crescimento. E os isolados foram capazes de completar o dimorfismo para fase leveduriforme após 24 meses de preservação nos três métodos de armazenamento.

Tabela 6. Diâmetro das Colônias

Armazenamento	Diâmetro 30°C Mediana (Min, Max)	*P- valor	Diâmetro 37°C Mediana (Min, Max)	P-valor
H ₂ O 6M	41,25 [19,00. 50,00]	1,000	11,00 [8,00. 14,50]	0,740
H ₂ O 12M	31,00 [21,00. 50,00]	0,800	9,25 [6,00. 12,00]	1,000
H ₂ O 18M	36,25 [21,00. 52,50]	1,000	10,12 [7,25. 12,50]	1,000
H ₂ O 24M	39,38 [18,25. 54,00]	1,000	8,79 [6,25. 11,00]	0,800
4°C 6M	36,50 [22,00. 63,00]	**-	10,50 [6,50. 11,50]	**-
4°C 12M	32,50 [20,00. 55,50]	0,160	7,00 [6,00. 11,50]	1,000
4°C 18M	33,50 [17,25. 53,50]	0,520	8,38 [6,75. 12,75]	1,000
4°C 24M	37,50 [19,75. 53,75]	1,000	9,25 [5,25. 12,75]	1,000
-80°C 6M	29,50 [21,25. 50,00]	0,140	9,62 [4,50. 15,50]	1,000
-80°C 12M	34,00 [25,00. 50,00]	1,000	8,50 [4,50. 10,50]	1,000
-80°C 18M	41,12 [21,25. 50,33]	1,000	9,62 [7,25. 10,50]	1,000
-80°C 24M	41,62 [28,25. 51,25]	1,000	11,00 [8,25. 12,75]	1,000

*Teste de Wilcoxon, P- Valor ajustado pelo método de Bonferroni. Correlação do diâmetro das colônias a 30°C e 37°C antes da preservação, P- Valor <0,05. H₂O = preservação em água destilada. 4°C= preservação sob refrigeração a 4°C. -80°C= Criopreservação a -80°C. Tempo de armazenamento seis, doze, dezoito e vinte meses (6M, 12M, 18M e 24M). Antes da preservação a mediana a 30°C era 36,50 (Min 22,00, Max 63,00) e a mediana a 37°C era 10,50 (Min 6,50, Max 11,50). ** Os diâmetros das colônias foram constantes após seis meses de armazenamento a 4°C.

5.2.2.3 Assimilação de carboidratos

Todos os isolados apresentaram crescimento na presença da glicose, o que se manteve estável após a preservação nos três métodos e períodos avaliados. A variação mais acentuada foi quanto ao perfil de assimilação da sacarose, três isolados (IPEC 47514, IPEC 47535, IPEC 47550), antes de passarem pelos métodos de armazenamento não apresentavam crescimento na presença desse açúcar, após a preservação em todos os métodos assimilaram a sacarose (tabela 7). Essa variação impediu a identificação após a preservação desses isolados a nível de espécie, os quais foram caracterizados no momento do isolamento como *S. brasiliensis*.

Tabela 7. Alteração na assimilação da sacarose após preservação

Isolados	Sac T. zero	Sac H ₂ O 6M	Sac H ₂ O 12M	Sac H ₂ O 18M	Sac H ₂ O 24M	Sac 4°C 6M	Sac 4°C 12M	Sac 4°C 18M	Sac 4°C 24M	Sac -80°C 6M	Sac -80°C 12M	Sac -80°C 18M	Sac -80°C 24M
IPEC 47514	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
IPEC 47535	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
IPEC 47550	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+

Teste de assimilação de carboidratos realizado no momento do isolamento (T. zero) e após seis, doze e dezoito e vinte e quatro meses de preservação (6M, 12M, 18M e 24M). IPEC (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil). H₂O = método de preservação em água destilada, 4°C = método de preservação sob refrigeração a 4°C, -80°C = método de criopreservação a -80°C. Sac = sacarose. (+) crescimento na presença da sacarose. (-) ausência de crescimento na presença da sacarose.

Nenhum isolado assimilou a rafinose antes da preservação e esse perfil se manteve o mesmo em todos os períodos de armazenamento em água destilada e sob refrigeração a 4°C. Entretanto, após a criopreservação a -80°C a assimilação da rafinose apresentou alteração em apenas um isolado, IPEC 47559, o qual passou a assimilar a rafinose após 18 meses, o que também foi observado após 24 meses de armazenamento. Esse isolado antes da preservação foi caracterizado como *Sporothrix* spp. passando a ser identificando como *S. mexicana* após a alteração na rafinose pela chave taxonômica, considerando apenas testes fenotípicos.

5.2.3 Estabilidade Genotípica

A avaliação da estabilidade genotípica realizada pelo sequenciamento parcial do gene codificador da β -tubulina apresentou alto grau de concordância entre os três métodos de preservação. Todos os isolados de *S. brasiliensis* após armazenamento em água destilada, a 4°C e a -80°C permaneceram agrupados no mesmo clado, assim como o isolado de *S. schenckii* (IPEC47559), (figura 12).

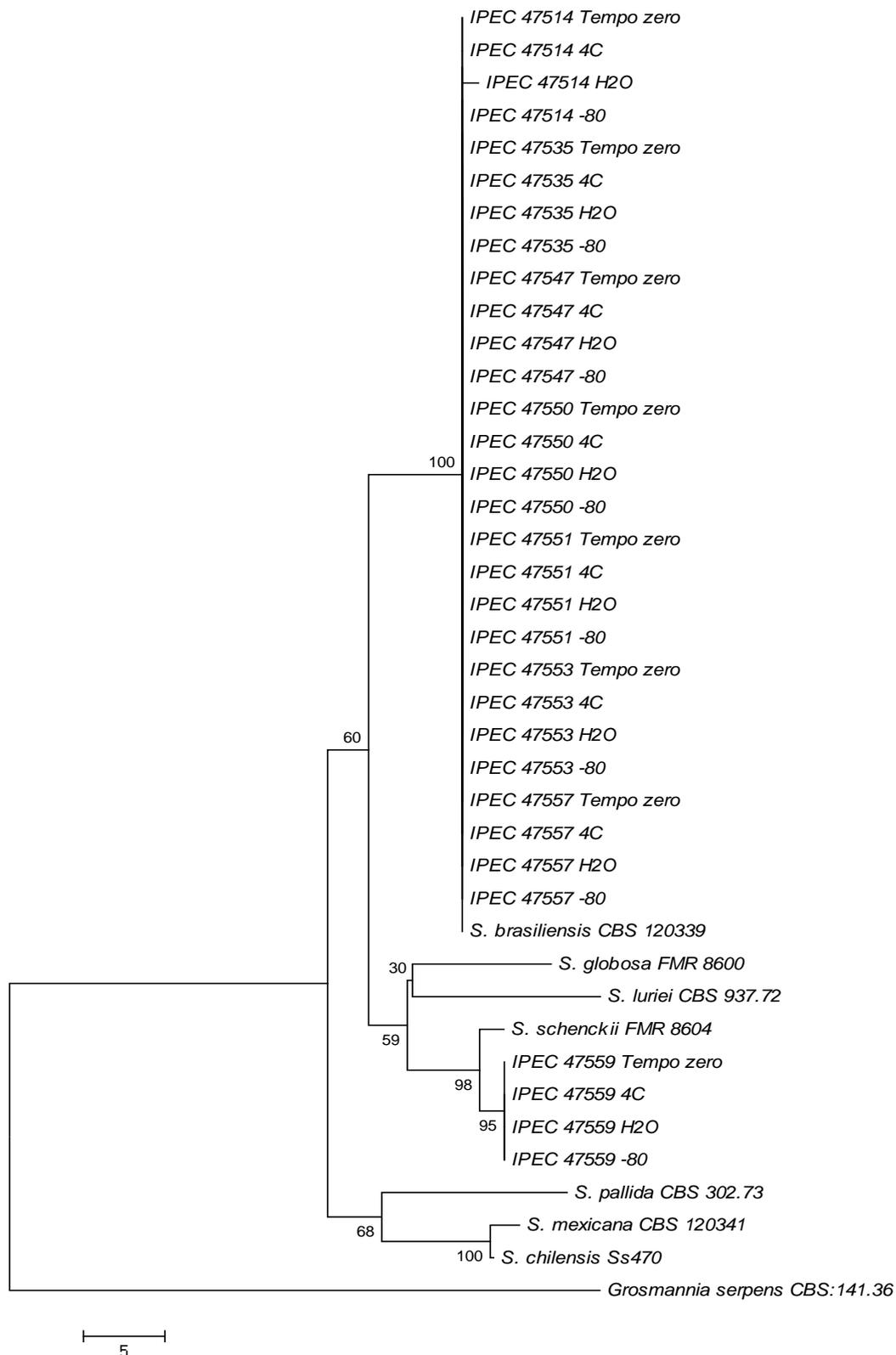


Figura12. Estabilidade Genotípica. Árvore filogenética do gene parcial da β -tubulina realizada para os oito isolados no tempo zero e após 24 meses de preservação. Método de *Neighbor-Joining*. Significância realizada por meio do teste de confiança *Bootstrap* com 1.000 repetições indicado nos nós formados na árvore filogenética. Tempo zero isolados antes de serem preservados. H₂O = preservação em água destilada. 4C= preservação sob refrigeração a 4°C. -80°C= Criopreservação a -80°C. IPEC, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil.

No entanto, dois isolados de *S. brasiliensis* (IPEC 47514 e IPEC 47553) apresentaram substituição de pares de bases, após a preservação em água destilada. No isolado IPEC 47514 foi observado um polimorfismo em dois pares de bases nas posições: 34 (G / C) e 92 (G / A). Já no isolado IPEC 47553 ocorreu uma substituição na posição 66 (A / T). Enquanto nos outros métodos de preservação não ocorreram alterações nas sequências de DNA. Entretanto os isolados que apresentaram alterações após 24 meses de preservação em água destilada, foram identificados corretamente e apresentaram 99% de similaridade com a cepa tipo de *S. brasiliensis*.

Apesar das alterações não terem comprometido a identificação, após a preservação, o isolado IPEC 47514, apresentou também alterações nas sequências de aminoácidos, enquanto a alteração no gene da β -tubulina no isolado IPEC 47553 não alterou a sequência de aminoácidos.

5.2.4 MALDI-TOF MS

Os resultados anteriores de caracterização a nível de espécie corroboraram com a espectrometria de massa (MALDI-TOF MS), sete isolados também foram identificados como *S. brasiliensis* e um isolado identificado como *S. schenckii* (IPEC47559) após 24 meses de armazenamento. No entanto, algumas divergências na distribuição dos isolados por clados foram observadas quando comparamos a análise filogenética com base no perfil proteômico (Figura 13) com o perfil genotípico pelo sequenciamento parcial da beta tubulina (Figura 12).

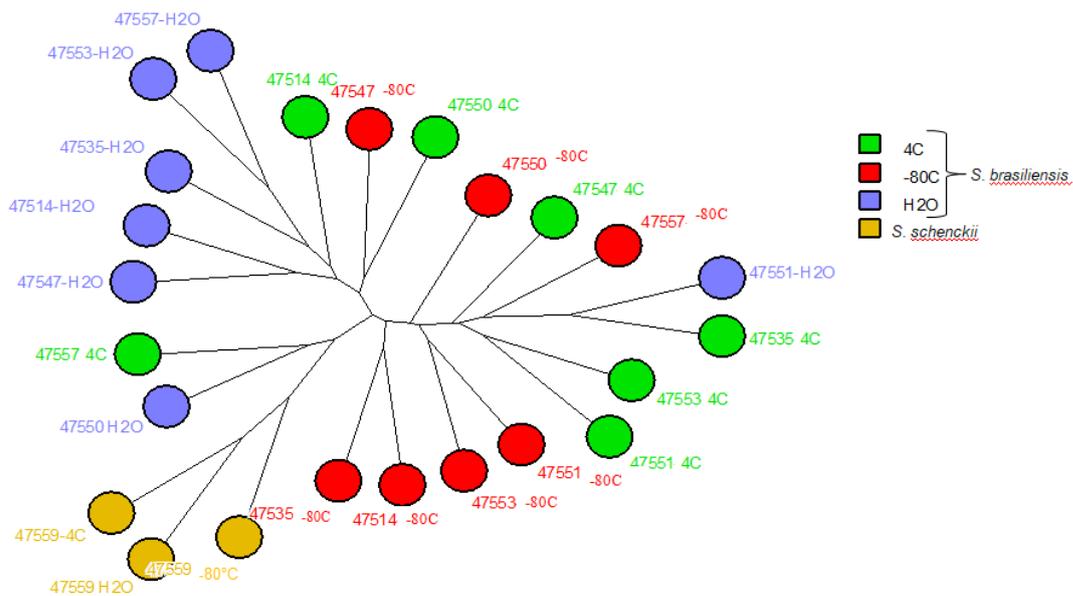


Figura 13. Árvore filogenética MALDI-TOF MS. *Neighbor Joining* baseada na correlação de Pearson construída com espectros obtidos por MALDI-TOF MS de 24 isolados distribuídos de acordo com a espécie e o método de preservação. Cada nó representa o espectro de uma cepa de *Sporothrix*, nas diferentes metodologias de preservação apresentados em diferentes cores (conforme legenda).

Os isolados de *S. brasiliensis* na análise proteômica após 24 meses de preservação ficaram melhor agrupados de acordo com o método de preservação como pode-se observar na Figura 13 e não por isolado, como na análise filogenética pela β -tubulina (Figura 12). A variabilidade no perfil protéico de acordo com o método de preservação pode ser observada, no exemplo do isolado IPEC 47547 *S. brasiliensis* (figura 14). Com base nesse exemplo observamos variação no perfil proteômico de um mesmo isolado em métodos de preservação diferentes.

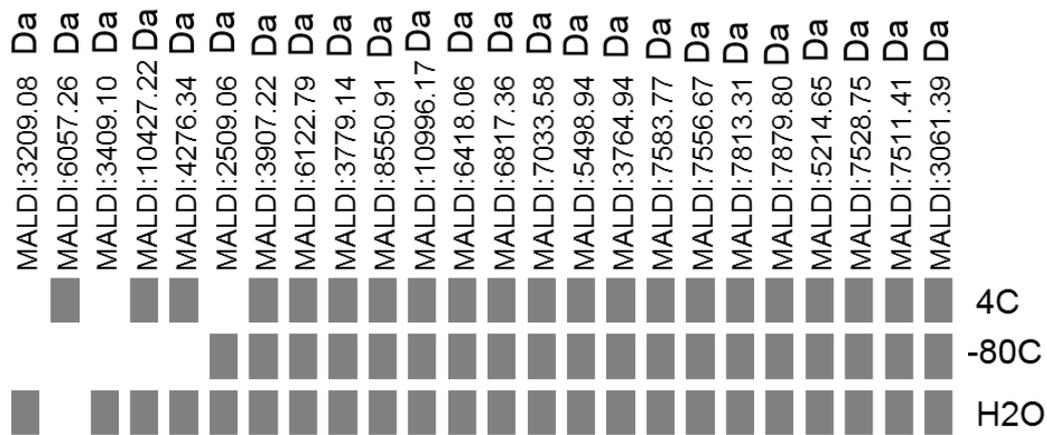


Figura 14. Perfil proteômico do MALDI-TOF MS para um isolado de *S. brasiliensis*. IPEC 47547 selecionado para exemplificar as diferenças no perfil proteômico de um mesmo isolado preservado por diferentes métodos. A observação dos retângulos na cor cinza indica a presença dos espectros proteicos, com peso molecular indicado ao lado.

6 DISCUSSÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea de distribuição mundial. Essa infecção é causada por alguns fungos dimórficos do gênero *Sporothrix* (Marimon et al., 2007, Chakrabarti et al., 2015; ZHANG et al 2015). Com a recente descrição de novas espécies, torna-se importante a identificação correta desses fungos e o armazenamento em coleções de culturas. Existem poucos estudos sobre a preservação de *Sporothrix* spp., os descritos na literatura especializada foram realizados antes da descrição das novas espécies patogênicas ou não utilizaram ferramentas moleculares na avaliação da estabilidade genotípica após a preservação por diferentes metodologias (BORBA, SILVA e OLIVEIRA, 1992; CAPRILES et al., 1993; LIMA e BORBA, 2001; LIMA, SCHÄFFER e BORBA, 2003; LIMA et al, 2004; MENDOZA et al., 2005, BRILHANTE et al., 2015). Embora alguns métodos de preservação considerados eficazes, devem ser avaliados de acordo com a espécie a ser preservada.

O método clássico de Castellani, o mais tradicional em micologia, é utilizado para uma variedade de gêneros e espécies de fungos e apresenta bons resultados quanto à preservação das características, viabilidade e virulência das culturas fúngicas, após o armazenamento por longos períodos, além de ser um método simples, podendo ser utilizado especialmente em laboratórios com recursos limitados (FINATTI et al., 2009; PASSADOR et al., 2010; PIRES, APARECIDO e FINATTI, 2012). No entanto, esse método de preservação no presente estudo apresentou limitações, devido à contaminação por fungos anemófilos, após a recuperação em meio PDA. Para viabilizar a recuperação dos isolados de *Sporothrix* spp. foi utilizado o meio Mycosel, meio seletivo que contém cloranfenicol, um antibiótico de largo espectro que inibe o crescimento bacteriano e cicloheximida, a qual inibe parcialmente ou totalmente o crescimento de fungos anemófilos (ANVISA, 2013).

Mendoza e colaboradores (2005) também observaram contaminação após isolados de *S. schenckii lato senso* serem preservados por 18 anos em água destilada a temperatura ambiente. Os isolados foram recuperados em Agar Sabouraud e dos cinco preservados, um apresentou contaminação, porém não impediu o seu reisolamento. Em outro estudo de Borba e colaboradores (1992), referente à viabilidade e a estabilidade morfológica de quatro isolados de *S. schenckii lato sensu* armazenados por 23 anos em água destilada, que também foram recuperadas em

Agar Sabouraud, não foram observadas contaminações após o re-isolamento, além de ter sido preservada a morfologia dos isolados. A análise da estabilidade morfológica foi realizada, por meio do microcultivo em lâmina e as estruturas morfológicas permaneceram inalteradas após o armazenamento, porém não foram avaliadas a estabilidade de outras características fenotípicas, como por exemplo, a termotolerância e o dimorfismo (BORBA, SILVA e OLIVEIRA, 1992).

Para evitar a contaminação observada no método de preservação em água destilada, uma alternativa seria armazenar a cultura na água a temperatura refrigerada, uma vez que os isolados preservados a 4°C e a -80°C no presente estudo foram recuperados sem contaminantes. Richter (2008) avaliou a preservação de 69 isolados de *basidiomicetos* representantes de 48 espécies, armazenados em água destilada a 5°C por 20 anos. Transcorrido o período de preservação, 57 isolados (82,6%) apresentaram crescimento e não foi relatada a presença de contaminantes

Em um estudo recente, no qual foi avaliada a preservação de 20 isolados de *Sporothrix* spp., mantidos sob diferentes temperaturas, 4°C, -20°C e -80°C por 3, 6 e 9 meses de preservação, também demonstrou 100% de viabilidade, independente da temperatura de armazenamento e do tempo de preservação. Além disso, o método de preservação às temperaturas de 4°C ou -20°C não sofreram alterações no número dos conídios produzidos após o armazenamento (BRILHANTE et al., 2015).

Segundo a literatura, o método de preservação a baixas temperaturas pode provocar perda do material biológico, por isso, crioprotetores devem ser utilizados para evitar danos às células durante o processo de congelamento. O uso do glicerol como crioprotetor tem demonstrado bons resultados (AGUIAR et al., 2012; ATCC 2013), bem como, a associação do glicerol a outros agentes protetores, a lactose e a sacarose para preservar isolados de *Sporothrix* spp.. Permitindo 100% de viabilidade, após a preservação à baixas temperaturas, conforme descrito por Brilhante et al. (2015). Todavia, nesse estudo não foram avaliadas as possíveis alterações no fenótipo utilizando açúcares como crioprotetores, uma vez que a sacarose faz parte das provas de caracterização fenotípicas descrita por Marimon e colaboradores (2007) e utilizadas em nossas análises, sendo a fonte de carboidrato, a sacarose uma das características fenotípicas mais alteradas entre os isolados durante o período de preservação avaliado, conforme tabela 7. A presença constante desse ou de outro carboidrato poderia induzir a expressão de genes permitindo a assimilação do açúcar, o que comprometeria os resultados de identificação conforme a chave taxonômica.

De acordo com as características descritas na chave taxonômica, poucos isolados foram identificados em nível de espécie antes do armazenamento (tabela 3). Por exemplo o isolado IPEC 47559 apresentou diâmetro da colônia superior a 50 mm (63 mm) a 30°C, uma característica fenotípica descrita para *S. mexicana*, *S. pallida* e *S. luriei* (Marimon et al., 2007), no entanto pela análise molecular esse isolado foi identificado como *S. schenckii* (Figuras 7, 8 e 9). Dados semelhantes também foram descritos por Oliveira e colaboradores (2011), relataram maior crescimento a 30°C em isolados de *S. schenckii*. Outros autores também relataram que a identificação apenas pelas características fenotípicas pode ser inconclusiva ou apresentar resultados ambíguos, demonstrando a necessidade do uso de outros métodos para identificar as espécies de *Sporothrix* (OLIVEIRA et al., 2011, RODRIGUES et al., 2013, OTTONELLI STOPIGLIA et al., 2014; CAMACHO et al., 2015). Esses resultados sugerem que a discordância na identificação está associada à variabilidade fenotípica intraespecífica e não necessariamente ao método de preservação utilizado, sendo a primeira vez que a avaliação da estabilidade fenotípica foi realizada, comparando as características dos isolados de *Sporothrix* spp. no momento do isolamento com as características após a preservação.

Camacho e colaboradores (2015) observaram baixa correlação entre a identificação realizada por meio da chave taxonômica com os métodos moleculares, apenas 8 dos 29 isolados avaliados no estudo foram identificados em nível de espécie pelas características fenotípicas, sendo que esses isolados estavam armazenados em água destilada (método de Castellani) por um período de 40 anos. Dos 29 isolados, 20 eram *S. schenckii* e 9 *S. globosa*, diferente do número e de espécies avaliadas em nosso estudo. Entretanto esses dados ressaltam mais uma vez a importância de utilizar métodos de preservação padronizados que permitam a estabilidade fenotípica dos isolados e que não alterem características importantes das espécies, porém no estudo de camacho e colaboradores (2015) não se têm os dados antes da preservação, não podendo então afirmar que o método de preservação em água destilada não garantiu a estabilidade fenotípica. Por sua vez, em alguns estudos com outras espécies de fungos foram descritas alterações fenotípicas após o armazenamento em água destilada.

Borman e colaboradores (2006) observaram alterações morfológicas, após o armazenamento em 20% dos dermatófitos preservados em água destilada. As principais mudanças observadas foram proliferação na produção de micélio estéril,

com reduções associadas na conidiogênese e perda da coloração característica das colônias. Essa modificação na cor da colônia impediu a identificação dos isolados com base na macromorfologia após o armazenamento. Em outro estudo, Karabiçake colaboradores (2016) também observaram variações semelhantes em dermatófitos preservados em água destilada, com a proliferação de micélio estéril, e reduções associadas na conidiogênese. Além dessas alterações, os isolados de *Trichophyton rubrum* perderam a coloração típica da colônia, após o armazenamento em água destilada (Karabiçak et al.,2016).

O método de preservação sob refrigeração a 4°C manteve estável as características macro e micromorfológicas dos isolados, durante os períodos de armazenamento, assim como manteve a estabilidade nas provas de caracterização fenotípica de isolados de *Sporothrix* spp. por até seis meses de preservação.

O método de armazenamento sob refrigeração a 4°C pode ser uma alternativa para a preservação de culturas fúngicas por um curto período de armazenamento. Aprimorando o método clássico por repicagens periódicas, evitando maiores manipulações das cepas e consequentemente alterações, como descrito por FIGUEIREDO (2001) e como também já foi demonstrado para isolados de *Sporothrix* spp. por Brilhante e colaboradores (2015). Uma alternativa viável para laboratórios clínicos com recursos limitados, que poderiam armazenar os isolados com menor modificação até o envio à laboratórios de referência ou coleções de cultura para a identificação das espécies de *Sporothrix* spp..

Na análise do método de preservação a -80°C em nosso estudo a observação de alterações morfológicas após os períodos de armazenamento foram significativas, devido a perda da cor da colônia e perda do pigmento dos conídios no isolado de *S. brasiliensis*, IPEC 47553, após criopreservação (Figura 11C e 11D). Alteração semelhante na morfologia dos conídios foram descritas por Marimon e colaboradores (2007), na cepa tipo de *S. schenckii* (CBS 359.36), tradicionalmente descrita como tendo conídios pigmentados, produziu apenas conídios do tipo simpodial e hialino, perdendo a capacidade de produzir conídios sésseis e pigmentados no estudo desses autores, porém não foi relatado em qual método a cepa estava armazenada. No entanto devemos destacar que no presente estudo a preservação a -80°C foi realizada com os isolados de *Sporothrix* spp. em sua fase leveduriforme, e resultados diferentes poderiam ser obtidos com a preservação da fase filamentosa. Sendo uma importante questão para ser responder em estudo futuros com isolados de *Sporothrix* spp..

A outra característica fenotípica avaliada, o diâmetro das colônias a 30°C não apresentou alteração após o armazenamento, bem como a termotolerância, todos os isolados cresceram a 37°C em todos os períodos avaliados. Nossos resultados corroboram com os descritos por Mendoza e colaboradores (2005), neste estudo, cinco isolados de *S. schenckii lato sensu* preservados em água destilada e por subcultivo contínuo durante 18 anos cresceram a 35°C e 37°C, e também foram capazes de completar o dimorfismo após o armazenamento. Conforme observado em nosso estudo os isolados também converteram para fase leveduriforme após 24 meses de armazenamento nos três métodos de preservação.

Em um outro estudo, Lima e Borba, (2001), também avaliaram a estabilidade do dimorfismo em isolados de *S. schenckii lato sensu*, *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum var. capsulatum*, preservados em óleo mineral, por período que variou de 8 a 49 anos, somente os isolados de *Sporothrix schenckii lato sensu* foram capazes de completar todo o processo dimórfico. Além disso foi a espécie que apresentou a melhor taxa de sobrevivência, após o armazenamento em óleo mineral.

Na avaliação da assimilação de carboidratos, a principal alteração ocorreu no perfil da sacarose, três isolados de *S. brasiliensis* (IPEC 47514, 47535 e 47550), passaram a assimilar a sacarose após o armazenamento em todos os métodos. Essa variação na assimilação da sacarose alterou a identificação da espécie após a preservação e esses isolados não puderam ser identificados pelas características fenotípicas (tabela 5). E a alteração na assimilação da rafinose ocorreu em apenas um isolado de *S. schenckii*, IPEC 47559, somente após 18 e 24 meses de armazenamento a -80°C. Antes da preservação esse isolado não assimilava a rafinose e não pôde ser identificado pela chave taxonômica, após a alteração foi identificado como *S. mexicana* (tabela 5).

Os testes bioquímicos normalmente são utilizados para identificar espécies de leveduras e bactérias, sendo comumente empregado o teste de assimilação de carboidratos. Sendo assim, as alterações fenotípicas podem ocasionar erros na identificação dos microrganismos (SANDVEN, 1990; SCHWARZ et al., 2007). Em um estudo de Mendoza e colaboradores (2005) foi descrita a inibição completa da capacidade de hidrolisar o amido em isolados de *S. schenckii lato sensu* após 18 anos de armazenamento em água destilada.

Apesar de algumas alterações fenotípicas terem sido observadas após o armazenamento nos três métodos, a estabilidade genotípica avaliada pelo

sequenciamento parcial do gene codificador da β -tubulina, demonstrou que ambos os métodos de armazenamento sugerem a preservação das características genéticas, permitindo a identificação das espécies após o armazenamento por esse gene. Contudo é necessário um período mais longo de armazenamento para confirmar a estabilidade genotípica, bem como a avaliação da estabilidade por outros genes constitutivos e por outras metodologias.

Alterações pontuais foram observadas em dois isolados (IPEC 47514 e IPEC 47553), após preservação em água destilada. Broughton e colaboradores (2012) também observaram polimorfismos genéticos em isolados do gênero *Trichoderma*, após criopreservação em nitrogênio líquido, mesmo sendo esse um método padronizado e utilizado em muitas coleções microbiológicas, também pode induzir a mudanças genéticas. Entretanto, como observado no presente estudo o baixo número de polimorfismos não comprometeu a identidade dos isolados após o armazenamento.

A β -tubulina é uma das proteínas presentes em organismos eucarióticos, sendo uma das proteínas estruturais dos microtúbulos que formam o citoesqueleto (RAFF 1984; CLEVELAND e SULLIVAN, 1985; SMITH et al., 1988; MCKEAN, VAUGHAN e GULL, 2001). Os microtúbulos estão envolvidos em vários processos essenciais, incluindo divisão celular, mobilidade, transporte intracelular, entre outros (SMITH et al., 1988; RAFF 1984; CLEVELAND e SULLIVAN, 1985; MCKEAN, VAUGHAN e GULL et al., 2001). Além disso, participam na mediação das transições morfológicas de fungos dimórficos e do crescimento das hifas em diversos fungos patogênicos (HARRIS, KEATH e MEDOFF, 1989; YOKOYAMA et al., 1990; AKASHI, KANBE e TANAKA, 1994). Por esses fatores, alterações no gene que codifica a β -tubulina poderiam comprometer os processos envolvendo os microtúbulos. Estudo de Zhang e colaboradores (2017) demonstra a importância da participação da tubulina em processos patogênicos, uma vez que a perda da β -tubulina por mutação induzida, reduziu a capacidade de *Metarhizium acridum* em infectar insetos hospedeiros quando aplicado topicamente e quando injetado diretamente no hospedeiro (Zhang et al., 2017). Esses dados justificam a escolha pelo gene da β -tubulina para avaliação da estabilidade genotípica, devido a sua importância na estrutura celular dos fungos, conforme relatado nos trabalhos acima. Entretanto, a avaliação da estabilidade de outros genes que também estão relacionados a estrutura de células fúngicas, como o gene codificador da quitina sintase seria importante de ser avaliado após a

preservação, dado que, alterações nesse gene poderia afetar a virulência de isolados de *Sporothrix* spp., como demonstrado anteriormente (FREITAS et al., 2015).

A caracterização em nível de espécie por espectrometria de massa (MALDI TOF MS) foi possível em todos os isolados preservados nos três métodos, possibilitando identificar corretamente os isolados após 24 meses de armazenamento. Em um estudo de Lima-Neto e colaboradores (2014), também foi empregado o MALDI-TOF MS para reclassificar 40 isolados clínicos de *Candida* spp. preservados entre 1 a 52 anos em coleção de cultura. Desses isolados preservados, 15% apresentaram discordância com a identificação morfológica e bioquímica, porém a identificação realizada por MALDI-TOF MS foi confirmada pelo sequenciamento da região ITS e por meio dessas abordagens combinadas, cinco isolados puderam ser corretamente renomeados e uma nova espécie foi adicionada à coleção. Corroborando com nosso estudo, todos os isolados apresentaram 100% de concordância entre a metodologia proteômica (MALDI-TOF MS) e as genotípicas, PCR *Fingerprinting*, sequenciamento parcial dos genes calmodulina e B-tubulina. Sendo assim a técnica de identificação realizada por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) é uma ferramenta rápida, robusta e confiável para identificar espécies de *Sporothrix* spp. preservadas em coleções de cultura por até dois anos.

No entanto, no presente estudo a avaliação da estabilidade do perfil proteico comparando os três métodos, preservação em água destilada, armazenamento a 4°C e -80°C apresentou diferenças quando os métodos de preservação foram comparados (figuras 13 e 14). Na mesma proporção, Shah e colaboradores (2008) avaliaram 20 cepas de sete espécies de bactérias, as quais foram analisadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS), para verificar a consistência do perfil das moléculas associadas à superfície das células preservadas em discos de lenticula e em ampolas liofilizadas tradicionalmente e os perfis espectrais de massa em ambos os métodos mostraram um alto grau de concordância. Entretanto no presente estudo, conforme destacado na figura 14, um mesmo isolado quando preservado por metodologias diferentes apresentou perfil proteico diferente, podendo concluir que o tipo de metodologia de preservação utilizada gera alterações no perfil proteico do isolado de *S. brasiliensis*. Fato esse evidenciado pela análise filogenética apresentada na figura 13, na qual os isolados tendem a se agrupar em clados segundo a metodologia de preservação utilizada. O que reforça a necessidade de mais estudos empregando o

MALDI-TOF MS para avaliar a estabilidade dos isolados fúngicos preservados por diferentes metodologias.

Os métodos de preservação, em água destilada, armazenamento 4°C e criopreservação a -80°C foram capazes de preservar a capacidade de utilizar o gene da β -tubulina para a identificação de *Sporothrix* spp. por 24 meses de armazenamento, apesar de um baixo polimorfismo ter ocorrido em dois isolados de *S. brasiliensis* preservados em água destilada.

Dentre os métodos de preservação, o armazenamento a 4°C foi o mais efetivo para preservar os isolados de *Sporothrix* spp., pois manteve mais estável as características fenotípicas e genotípicas, além da ausência de contaminantes. Podendo ser sugerido como um método de preservação de *Sporothrix* spp., em coleções de culturas com recursos limitados, por ser um método simples e de baixo custo, porém um número maior de isolados de *Sporothrix* spp. precisa ser analisado para sugerirmos o mesmo com uma metodologia padrão. No entanto, esse estudo demonstra, pela primeira vez, o impacto de três diferentes métodos de preservação na caracterização por taxonomia polifásica em isolados de *Sporothrix* spp. armazenados por até dois anos em coleções de cultura.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Os três métodos estudados mantiveram a viabilidade de *Sporothrix* spp. por até 24 meses de preservação.
- ✓ O meio de cultura Mycosel é indicado para o re-isolamento das cepas preservadas em água destilada.
- ✓ É possível a ocorrência de alterações fenotípicas após o armazenamento em água destilada, a 4°C e -80°C que alterem a identificação de *Sporothrix* spp. pela chave taxonômica. Essa alteração após o armazenamento também pode ocorrer de cepa para cepa.
- ✓ Os métodos de preservação, armazenamento em água destilada, 4°C e -80°C foram capazes de preservar a estabilidade do gene codificador da β -tubulina permitindo a identificação dos isolados após 24 meses de armazenamento.
- ✓ O método de preservação a 4°C foi o mais efetivo para preservar os isolados de *Sporothrix* spp., mantendo mais estável as características fenotípicas e genotípicas, além de não ter apresentado contaminações.

8 PERSPECTIVAS PARA O TRABALHO

1. Avaliar a estabilidade genética de isolados de *Sporothrix* spp. por meio de outras ferramentas moleculares e outros genes constitutivos;
2. Avaliar um número maior de isolados de *Sporothrix* spp.;
3. Avaliar os métodos de preservação liofilização e armazenamento em nitrogênio líquido para isolados de *Sporothrix* spp..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, T.; TEIXEIRA, M.; TELES, C.; MARTINS, G.; JÚNIOR, R.; COSTA, E. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 80–93, 2012.
- AKASHI, T.; KANBE, T.; TANAKA, K. The role of the cytoskeleton in the polarized growth of the germ tube in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 140, n. 2, p. 271–280, fev. 1994.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; ARAÚJO, G. de S.; DE OLIVEIRA, M. M. E.; GERFEN, G. J.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8623–8630, dez. 2012.
- ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, p. e3094, set. 2014.
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, M. M. E.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–10, 2015.
- ALMEIDA-PAES, R.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BRITO-SANTOS, F.; ALMEIDA-SILVA, F.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152796, mar. 2016.
- ALMEIDA-PAES, R.; BRITO-SANTOS, F.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; MACHADO, A. C. S.; OLIVEIRA, M. M. E.; PEREIRA, S. A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; et al. Minimal inhibitory concentration distributions and epidemiological cutoff values of five antifungal agents against *Sporothrix brasiliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 5, p. 376–381, maio 2017.
- ALONSO, S. Novel Preservation techniques for microbial cultures. **Novel Food Fermentation Technologies**. p. 7–33, 2016.
- ALVES, S. H.; BOETTCHER, C. S.; OLIVEIRA, D. C.; TRONCO-ALVES, G. R.; SGARIA, M. A.; THADEU, P.; OLIVEIRA, L. T.; et al. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 523–525, out. 2010.
- American Type Culture Collection. **ATCC® Mycology culture guide tips and techniques for culturing yeasts and filamentous fungi**. 2013.

ANVISA, A. N. D. V. S. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 8: detecção e identificação dos fungos de importância médica.** v. 9, 2013.

APARECIDO, C.; HUANG, C.; PASSADOR, M.; FINATTI, D.; FIGUEIREDO, M. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de castellani (água destilada) e liofilização. **Biológico, São Paulo**, v. 69, n. 1, p. 5–8, 2007.

APARECIDO, C.; CAMILO, C. Comparação de métodos para a preservação de fungos do gênero *colletotrichum* em laboratório. **Biológico, São Paulo**, v. 75, n. 1, p. 17–22, 2013.

ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINE, M.; GENIS, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651–655, jul. 2009.

BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO. Sem ano. Disponível em: <http://bcry.org.br/sobre-bcry/quem-somos-2/>. Acesso em: 19 mar. 2018.

BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO. Sem ano. Disponível em: <http://bcry.org.br/sobre-bcry/historico/>. Acesso em: 19 mar. 2018.

BARBA BORREGO, J. A.; MAYORGA, J.; TARANGO-MARTÍNEZ, V. M. Esporotricosis linfangítica bilateral y simultánea. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 247–249, out. 2009.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; SCHUBACH, A. O.; MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 777–779, ago. 2001.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; SCHUBACH, T. M. P.; DOS REIS, R. S.; CONCEIÇÃO, M. J.; VALLE, A. C. F. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Dermatology**, v. 42, n. 9, p. 677–681, set. 2003.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; VALLE, A. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; SILVA, C.F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 529–535, fev. 2004.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. O. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 455–60, 2010.

BARROS, M. B. L.; ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633–654, out. 2011.

BERBEE, M. L.; TAYLOR, J. W. 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. **Experimental Mycology**, v. 16, n. 1, p. 87–91, mar. 1992.

BOECHAT, J. S.; OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; GREMIÃO, I. D. F.; MACHADO, A. C. S.; OLIVEIRA, R. V. C.; FIGUEIREDO, A. B. F.; et al. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n.3,185-196, mar. 2018.

BORBA, C. M.; DA SILVA, A. M.; DE OLIVEIRA, P. C. Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporothrix schenckii* strains. **Mycoses**, v. 35, n. 7–8, p. 185–188, ago. 1992.

BORBA, C. M.; RODRIGUES, F. R. Viability and sporulating capability of *Coelomycetes* preserved under a range of different storage regimes. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 17, n. 4, p. 142–145, dez. 2000.

BORBA, C. M.; SCHÄFFER, G. M. V. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. **Mycoses**, v. 45, n. 5–6, p. 174–179, jun. 2002.

BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; CAMPBELL, C. K.; JOHNSON, E. M. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 361–368, jun. 2006.

BRILHANTE, R. S. N.; SILVA, N. F.; DE LIMA, R. A. C.; CAETANO, E. P.; DE ALENCAR, L. P.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M; MOREIRA, J. L. B.; et al. Easy storage strategies for *Sporothrix* Spp. strains. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, n. 2, p. 131–134, abr. 2015.

BROUGHTON, R.; BUDDIE, A. G.; SMITH, D.; RYAN, M. J. The effect of cryopreservation on genomic stability in strains of the fungus trichoderma. **Cryo Letters**, v. 33, n. 4, p. 299–306, ago. 2012.

BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: the influence of in vitro passage and storage. **Mycopathologia**, v. 109, n. 1, p. 13–17, jan. 1990.

BRUNKE, S.; MOGAVERO, S.; KASPER, L.; HUBE, B. Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 89–95, ago. 2016.

BULAWA, C. E.; MILLER, D. W.; HENRY, L. K.; BECKER, J. M. Attenuated virulence of chitin-deficient mutants of *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 23, p. 10570–

10574, nov. 1995.

CAMACHO, E.; LEÓN-NAVARRO, I.; RODRÍGUEZ-BRITO, S.; MENDOZA, M.; NIÑO-VEGA, G. A. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 94, dez. 2015.

CANHOS, V. P. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 27–29, July/Sept. 2003.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, p. 270–276, 1939.

CAVALCANTE, S. C.; FREITAS, R. S.; VIDAL, M. S. M.; DANTAS, K. C.; LEVI, J. E.; MARTINS, J. E. C. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 41–47, fev. 2007.

CAVALCANTI, S. D. B.; VIDAL, M. S. M.; SOUSA, M. da G. T. de; DEL NEGRO, G. M. B. Viability and molecular authentication of *Coccidioides* spp. isolates from the Instituto de Medicina Tropical de São Paulo culture collection, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 1, p. 7–11, fev. 2013.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, jan. 2015.

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, mar. 2016.

CHOAPPA, R. M. C.; OYARZO, P. I. V.; SILVA, L. C. C. Aislamiento de *Sporothrix pallida* complex en muestras clínicas y ambientales de Chile. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 4, p. 311–314, out / dez. 2014.

CLEVELAND, D. W.; SULLIVAN, K. F. Molecular biology and genetics of tubulin. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p. 331–365, 1985.

COLEÇÃO BRASILEIRA DE MICROORGANISMOS DE AMBIENTE E INDÚSTRIA. Sem ano. Disponível em: <http://splink.cria.org.br/manager/detail?resource=CBMAI>. Acesso em: 19 mar. 2018.

CORDEIRO, F. N.; BRUNO, C. B.; PAULA, C. D. R.; MOTTA, J. de O. C. Ocorrência familiar de esporotricose zoonótica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 121–4, jul / ago. 2011.

CORREIA, A.; SAMPAIO, P.; ALMEIDA, J.; PAIS, C. Study of molecular epidemiology of candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5899–5903, dez. 2004.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, MEDEIROS T.V; MELO, V. S. P. de; SUZANA APARECIDA COSTA ARAÚJO; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v. 19, n. 2, p. 111–122, 2009.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 380–407, mar. 2012.

CRUZ, R.; VIEILLE, P.; OSCHILEWSKI, D. Aislamiento ambiental de *Sporothrix globosa* en relación a un caso de esporotricosis linfo-cutánea. **Revista chilena de infectología**, v. 29, n. 4, p. 401–405, 2012.

DA SILVA, A. M.; BORBA, C. M.; DE OLIVEIRA, P. C. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses**, v. 37, n. 5–6, p. 165–169, jul. 1994a.

DA SILVA, M. B.; MARQUES, A. F.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 1, p. 197–205, jan. 2006.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, p. 165–191, mar. 2016.

DE CAPRILES, C. C.; MATA ESSAYAG, S.; LANDER, A.; CAMACHO, R. Experimental pathogenicity of *Sporothrix schenckii* preserved in water (Castellani). **Mycopathologia**, v. 122, n. 3, p. 129–133, jun. 1993.

DE MEYER, E. M.; DE BEER, Z. W.; SUMMERBELL, R. C.; MOHARRAM, A. M.; DE HOOG, G. S.; VISMER, H. F.; WINGFIELD, M. J. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 100, n. 4, p. 647–661, jul. 2008.

DELLA TERRA, P. P.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005903, 30 ago. 2017.

DIAS, N. M.; OLIVEIRA, M. M. E.; PORTELA, M. A.; SANTOS, C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; LIMA, N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1975–1976, out. 2011.

DIOGO, H. C.; SARPIERI, A.; PIRES, M. C. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 6, p. 591–4, 2005.

DIXON, D. M.; SALKIN, I. F.; DUNCAN, R. A.; HURD, N. J.; HAINES, J. H.; KEMNA, M. E.; COLES, F. B. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 1106–1113, jun. 1991.

EMBRAPA, sem ano. Disponível em: <https://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia/pesquisa-e-desenvolvimento/colecoes>. Acesso em: 19 mar. 2018.

EMBRAPA, sem ano. Disponível em: <https://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia/historia>. Acesso em: 19 mar. 2018..

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p.783-791, Jul. 1985.

FIGUEIREDO, M. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico, São Paulo**, v. 63, n. 1/2, p. 73–82, jan./dez. 2001.

FINATTI, D.; APARECIDO, C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação, em laboratório, de isolados do gênero *Verticillium*. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 76, n. 4, p. 715–720, out./dez. 2009.

FREIRE, A. K. L.; BENTES, A. dos S.; SAMPAIO, I. de L.; LIMA, A. M.; BOTINELI, F.; ROCHA, L. C.; SOUZA, J. B.; SOUZA, É. S. Availability and morphological characteristics of endophytic fungi held in different methods of preservation. **Scientific Research and Essays**, v. 11, n. 6, p. 76–79, mar. 2016.

FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F.; ALMEIDA-PAES, R.; BASTOS, F. I.; GALHARDO, M. C. G. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 453–453, fev. 2010.

FREITAS, D. F. S.; HOAGLAND, B.S; VALLE, A. C. F.; FRAGA, B. B.; DE BARROS, M. B.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; DE ALMEIDA-PAES, R.; et al. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 Cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 170–178, fev. 2012.

FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F.; DA SILVA, M. B. T.; CAMPOS, D. P.; LYRA, M. R.; DE SOUZA, R. V.; VELOSO, V. G.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; et al. sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3110, ago. 2014.

FREITAS, D. F. S.; LIMA, M. A.; ALMEIDA-PAES, R.; LAMAS, C. C.; VALLE, A. C. F.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; et al. Sporotrichosis in the central nervous system caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 4, p. 663–664, ago. 2015a.

FREITAS, D. F.; SANTOS, S. S.; ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, M. M.; VALLE, A. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; et al. Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 112–120, fev. 2015b.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Sem ano. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/colecoes-biologicas>. Acesso em: 19 mar. 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Oswaldo Cruz. Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos, CCFF. Rio de Janeiro, RJ. 2018. Disponível em: <http://ccff.fiocruz.br/index>. Acesso em: 15 fev. 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Oswaldo Cruz. Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos, CCFF. Histórico. Rio de Janeiro, RJ. 2018. Disponível em: <http://ccff.fiocruz.br/index?history>. Acesso em: 15 fev. 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Coleção de Fungos Patogênicos, CFP. Rio de Janeiro, RJ. 2017. Disponível em: <http://cfp.fiocruz.br/>. Acesso em: 15 fev. 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Leônidas e Maria Deane. Coleção de Fungos da Amazônia, CFAM. Rio de Janeiro, RJ. 2017. Disponível em: <http://cfam.fiocruz.br/>. Acesso em: 15 fev. 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Oswaldo Cruz. Coleção Micológica de Trichocomaceae. Rio de Janeiro, RJ. 2017. Disponível em: <http://cmt.fiocruz.br/>. Acesso em: 15 fev. 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Manual de organização de coleções biológicas da fiocruz**, 2017. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/vppcb-m-cb-001_manual_de_organizacao_colecoes_da_fiocruz_0.pdf. Acesso em: 15 fev. 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Oswaldo Cruz. **I Simpósio nacional de coleções científicas**, 2005. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/colecoessimposio.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2018.

GOO, N.-I.; KIM, D.-E. Rolling circle amplification as isothermal gene amplification in molecular diagnostics. **BioChip Journal**, v. 10, n. 4, p. 262–271, dez. 2016.

GOVENDER, N. P.; MAPHANGA, T. G.; ZULU, T. G.; PATEL, J.; WALAZA, S.; JACOBS, C.; EBONWU, J. I.; et al. An outbreak of lymphocutaneous sporotrichosis among mine-workers in South Africa. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004096, set. 2015.

GREMIÃO, I. D. F.; MIRANDA, L. H. M.; REIS, E. G.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, S. A. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, jan. 2017.

GUARRO, J.; GENÉ J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454–500, jul. 1999.

GUIMARÃES, L. C.; FERNANDES, A. P.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Methods to preserve potentially toxigenic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 43–47, 2014.

GUTIERREZ GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; VALLE, A. C. F.; ALMEIDA PAES, R.; SILVA T. P.; MONZON, A.; MELLADO, E.; et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Medical Mycology**, v. 46, n. 2, p. 141–151, jan. 2008.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F.; ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Epidemiological aspects of sporotrichosis epidemic in Brazil. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 4, p. 238–245, dez. 2015.

HAJJEH, R.; MCDONNELL, S.; REEF, S.; LICITRA, C.; HANKINS, M.; TOTH, B.; PADHYE, A.; et al. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 499–504, ago. 1997.

HARRIS, G. S.; KEATH, E. J.; MEDOFF, J. Characterization of alpha and beta tubulin genes in the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 7, p. 1817–1832, jul. 1989.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 4, ago. 2017.

HINTZ, W. E. Sequence analysis of the chitin synthase a gene of the dutch elm pathogen *Ophiostoma novo-ulmi* indicates a close association with the human pathogen *Sporothrix schenckii*. **Gene**, v. 237, n. 1, p. 215–221, set. 1999.

HOFLING, J.; GONÇALVES, R. **Isolamento e caracterização de fungos patogênicos de importância médica**. 1. ed. Jundiaí: Paco Editorial, 2016.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 469–488, out. 1996.

HOMOLKA, L. Preservation of live cultures of *Basidiomycetes* – recent methods. **Fungal Biology**, v. 118, n. 2, p. 107–125, fev. 2014.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; MATSUMOTO, T.; PADHYE, A. A.; MENDOZA, M.; NEGRONI, R. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. **Mycopathologia**, v. 142, n. 3, p. 115–118, 1998.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; VISMER, H.; MUIR, D. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in South Africa and Australia. **Medical Mycology**, v. 38, n. 6, p. 433–436, dez. 2000.

JOHNSON, G. C.; MARTIN, A. K. Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under Oil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 861–864, ago. 1992.

KARABIÇAK, N.; KARATUNA, O.; AKYAR, I. Evaluation of the viabilities and stabilities of pathogenic mold and yeast species using three different preservation methods over a 12-year period along with a review of published reports. **Mycopathologia**, v. 181, n. 5–6, p. 415–424, jun. 2016.

KÖNIG, H.; BERKELMANN-LÖHNERTZ, B. Maintenance of wine-associated microorganisms. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. p. 549–571, 2017.

KURY, A. B. **Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006.

LENARDON, M. D.; MUNRO, C. A.; GOW, N. A. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 416–423, ago. 2010.

LIMA, D. Preservação de espécies de *Fusarium* sob óleo mineral. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasília**, v. 26, n. 6, p. 853–855, jun.1991.

LIMA, R. F.; BORBA, C. D. M. Viability, Morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 18, n. 4, p. 191–196, dez. 2001.

LIMA, R. F.; SCHÄFFER, G. V.; BORBA, C. de M. Variants of *Sporothrix schenckii* with attenuated virulence for mice. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 11, p. 933–938, set. 2003.

LIMA, R. F.; SANTOS BRITO, M. M. dos; SCHÄFFER, G. M. V.; LIMA, O. C.; BORBA, C. D. M. Evaluation of the in vitro and in vivo dimorphism of *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Paracoccidioides brasiliensis* isolates after preservation in mineral Oil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 445–449, jun. 2004.

LIMA-NETO, R.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SAMPAIO, P.; PAIS, C.; NEVES, R. P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* Clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515–522, ago. 2014.

LIU, T.-T.; ZHANG, K.; ZHOU, X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 15, n. 1, p. 100–108, jan. 2014.

LOCKHART, S. R.; JACKSON, B. R.; VALLABHANENI, S.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. Thinking beyond the common *Candida* species: need for species-level identification of *Candida* Due to the emergence of multidrug-resistant *Candida auris*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3324–

3327, dez. 2017.

MADRID, H.; CANO, J.; GENÉ, J.; BONIFAZ, A.; TORIELLO, C.; GUARRO, J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 3, p. 218–222, set. 2009.

MAHMOUDI, S.; ZAINI, F.; KORDBACHEH, P.; SAFARA, M.; HEIDARI, M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: molecular identification and antifungal susceptibility. **Medical Mycology**, v. 54, n. 6, p. 593–599, ago. 2016.

MARIMON, R.; GENE, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; DOS SANTOS LAZERA, M.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251–3256, set. 2006.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENE, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, out. 2007.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 621–625, jan. 2008.

MARIO, D. A. N.; SANTOS, R. C. V.; DENARDI, L. B.; VAUCHER, R. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 1, p. 21–25, jan. 2016.

MCGUINNESS, S. L.; BOYD, R.; KIDD, S.; MCLEOD, C.; KRAUSE, V. L.; RALPH, A. P. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, northern territory, Australia. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, Jan. 2016.

MCKEAN, P. G.; VAUGHAN, S.; GULL, K. The extended tubulin superfamily. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. Pt 15, p. 2723–2733, ago. 2001.

MELLO, S.C.M.; SILVA, J.B.T.; WETZEL M.M.V.V. **Coleções de culturas microbianas no sistema nacional de pesquisa agropecuária**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110, N. 102).

MENDOZA, M.; ALVARADO, P.; DE TORRES, E. D.; LUCENA, L.; DE ALBORNOZ, M. C. Comportamiento fisiológico y de sensibilidad in vitro de aislamientos de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, n. 3, p. 151–156, set. 2005.

MENDOZA, M.; DIAZ, E.; ALVARADO, P.; ROMERO, E.; ALBORNOZ, M. C. B. Aislamiento de *Sporothrix schenckii* del medio ambiente en Venezuela. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 317–319, dez. 2007.

MESA-ARANGO, A. C.; REYES-MONTES, M. R.; PEREZ-MEJIA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZUNIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3004–3011, ago. 2002.

MILLER A. N; HUHNDORF S.M. Pyrenomycetes of the World: <http://www-s.life.illinois.edu/pyrenos/>. 2009.

MORRISON, A. S.; LOCKHART, S. R.; BROMLEY, J. G.; KIM, J. Y.; BURD, E. M. An Environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, p. 88–90, 2013.

MORTON, H.; PULASKI, E. The preservation of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 35, n. 2, p. 163–183, fev. 1938.

NATH, R.; LAHON, P.; TIMUNG, L. Molecular identification and phenotypic characterisation of *Sporothrix globosa* from clinical cases of eastern assam, north-east India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 269–273, jun. 2017.

NEYRA, E.; FONTEYNE, P. A.; SWINNE, D.; FAUCHE, F.; BUSTAMANTE, B.; NOLARD, N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1348–1352, mar. 2005.

NEUFELD, P.M; SARQUIS, M.I.M. Preservação em laboratório de fungos filamentosos pelo método do óleo mineral. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35 n.3, 147-150. 2003.

OCDE. **Versão brasileira do documento diretrizes da OCDE de boas práticas para centros de recursos biológicos**.DOQ-CGCRE-034 Revisão: 2012.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, v. 41, n. 1, p. 61–78, jan. 2000.

OLIVEIRA, M. M. E. **Identificação e análise filogenética de espécies do gênero *sporothrix* isoladas em área endêmica de esporotricose no estado do rio de janeiro**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; BARROS, M. B. L.; GUTIERREZ GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 359–363, maio 2010.

OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 257–267, out. 2011.

OLIVEIRA, M. M. E.; SAMPAIO, P.; ALMEIDA-PAES, R.; PAIS, C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2159–2162, jun. 2012.

OLIVEIRA, M. M. E.; VERÍSSIMO, C.; SABINO, R.; ARANHA, J.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; SAMPAIO, P.; PAIS, C. First autochthone case of sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 388–390, abr. 2014.

OLIVEIRA, M. M. E.; FRANCO-DUARTE, R.; ROMEO, O.; PAIS, C.; CRISEO, G.; SAMPAIO, P.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 6, mar. 2015a.

OLIVEIRA, M. M. E.; SANTOS, C.; SAMPAIO, P.; ROMEO, O.; ALMEIDA-PAES, R.; PAIS, C.; LIMA, N.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102–110, fev. 2015b.

O'REILLY, L. C.; ALTMAN, S. A. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2547–2552, 1 jul. 2006.

OROFINO-COSTA, R.; UNTERSTELL, N.; CARLOS GRIPP, A.; DE MACEDO, P. M.; BROTA, A.; DIAS, E.; DE MELO TEIXEIRA, M.; et al. Pulmonary cavitation and skin lesions mimicking tuberculosis in a HIV negative patient caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, p. 65–71, fev. 2013.

OROFINO-COSTA, R.; MACEDO, P. M.; RODRIGUES, A. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, out. 2017.

OTTONELLI-STOPIGLIA, C. D.; MAGAGNIN, C. M.; CASTRILLÓN, M. R.; MENDES, S. D. C.; HEIDRICH, D.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M. L. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 56–64, Jan. 2014.

PALACIO, A.; GUTIÉRREZ, Y.; ROJAS, D.; ATEHORTÚA, L.; ZAPATA, P. Viability of *Basidiomycete* fungal strains under different conservation methods: cryopreservation vs. freeze-drying processes. **Actualidades Biológicas**, v. 36, n.100, Jan./Jun. 2014.

- PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 897–910, nov. 2005.
- PASARELL, L.; MICHAEL R. MCGINNIS, M.R. Viability of fungal cultures maintained at -70°C. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 1000-1004, abr. 1992.
- PASSADOR, M.; PIRES, G.; FINATTI, D.; APARECIDO, C.; FIGUEIREDO, M. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca "Mário Barreto Figueiredo". **Biológico, São Paulo**, v. 72, n. 1, p. 51–55, jan./jun. 2010.
- PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Biochemical mutagens affect the preservation of fungi and biodiversity estimations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 77–85, jan. 2013.
- PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B.; BOECHAT, J. S.; VIANA, P. G.; SCHUBACH, T. M. P. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392–393, jun. 2014.
- PIRES, G.; APARECIDO, C.; FINATTI, D. Preservação em laboratório de fungos filamentosos por longos períodos de tempo. **Biológico, São Paulo**, v. 74, n. 1, p. 9–16, jan./jun. 2012.
- PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y. S. Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 339, n. 1, p. 1–9, fev. 2013.
- QIANGQIANG, Z.; JIAJUN, W.; LI, L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 Years. **Mycoses**, v. 41, n. 5–6, p. 255–257, jun. 1998.
- R. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- RAFF, E. C. Genetics of microtubule systems. **The Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 1 Pt 1, p. 1–10, jul. 1984.
- RAMOS, A. C. M. O.; OLIVEIRA, I. V. P. M.; REIS-LIMA, R. K.; PAULA, V. V.; FILGUEIRA, K. D. Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in northeastern Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 11, n. 1, p. 79–84, 31 mar. 2017.
- REIS, R. S.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; TAVARES, P. M. S.; MONTEIRO, P. C. F.; SCHUBACH, T. M. P.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 769–774, ago. 2009.
- Resolução SES Nº 674 DE 12/07/2013.

RICHTER, D. L. Revival of saprotrophic and mycorrhizal *Basidiomycete* cultures after 20 years in cold storage in sterile water. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 595–599, ago. 2008.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 405–412, maio 2013.

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M.M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2281, 20 jun. 2013.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383–387, abr. 2014.

RODRIGUES A.M; DE HOOG G. S; ZHANG Y; CAMARGO Z.P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes and Infections**, v. 3, n. 5, e32, mai. 2014.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, dez. 2015a.

RODRIGUES, A. M.; NAJAFZADEH, M. J.; DE HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 8 dez. 2015b.

RODRIGUES, A. M.; CRUZ CHOAPPA, R.; FERNANDES, G. F.; DE HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (*Ascomycota: Ophiostomatales*), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 246–264, fev. 2016.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; CAMARGO. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal – animal transmission. **PLOS Pathogens**, v.12, n.7, e1005638, Jul. 2016.

RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 159–165, abr. 1992.

ROMEO, O.; SCORDINO, F.; CRISEO, G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. **Mycopathologia**, v. 172, n. 3, p. 179–186, set. 2011.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696–3703, jun. 2000.

SAEKI, E. K; FARHAT, L. P; PONTESE, A. Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.2, p. 195-198, 2015.

SAITOU, N. NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n.4, p. 406-425, Jul. 1987.

SANGER, F NICKLEN, S. COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, n. 12, 5463-5467, dez. 1977.

SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 48, n. 1, p. 27–36, fev. 1990.

SARAVANAKUMAR, P. S.; ESLAMI, P.; ZAR, F. A. Lymphocutaneous sporotrichosis associated with a squirrel bite: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 647–648, set. 1996.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B. L; SCHUBACH, T. M. P.; VALLE, A. C. F; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; SUED, M.; SALGUEIRO, M.; et al. Primary Conjunctival Sporotrichosis: Two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cornea**, v. 24, n. 4, p. 491–493, maio 2005a.

SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M. P.; BARROS, M. B. L.; WANKE, B. Cat-transmitted Sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1952–1954, dez. 2005b.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B. L.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis: **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 129–133, abr. 2008.

SCHWARZ, P.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F.; DANNAOUI, E. Carbon assimilation profiles as a tool for identification of *Zygomycetes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1433–1439, mai. 2007.

SHAH, H. N.; MOLENAAR, L.; RAJAKARUNA, L.; RUSSELL, J. E.; DARE, D.; SUTTON, H.; HALLAS, G. Assessment of the stability of cell-surface components of microorganisms by MALDI-TOF-MS following preservation on lenticule discs. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 2, p. 284–290, ago. 2008.

SIGLER, L.; HARRIS, J. L.; DIXON, D. M.; FLIS, A. L.; SALKIN, I. F.; KEMNA, M.; DUNCAN, R. A. Microbiology and potential virulence of *Sporothrix cyanescens*, a fungus rarely isolated from blood and skin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 1009–1015, mai. 1990.

- SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 73–74, 2008.
- SILVA, L. M. C.; OLIVEIRA, F. D. M.; HOCHHEGGER, B.; SEVERO, L. C. Pulmonary sporotrichosis in Brazil: a case report and review. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 1, abr. 2013.
- SILVA, M. B. T.; COSTA, M. M. M.; TORRES, C. C.S.; GUTIERREZ GALHARDO, M. C.; VALLE, A. C. F. D.; MAGALHÃES, M.A. F. M.; SABROZA, P. C.; et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 28, n. 10, p. 1867–1880, out. 2012.
- SILVA, M. Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, Fiocruz, 8 mar. 2018.
- SINGHAI, M.; RAWAT, V.; VERMA, P.; JHA, P.; SHREE, D.; GOYAL, R.; UMESH. Primary pulmonary sporotrichosis in a Sub-Himalayan patient. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 4, n. 1, p. 48 – 49, Jan. 2012.
- SMITH, H. A.; ALLAUDEEN, H. S.; WHITMAN, M. H.; KOLTIN, Y.; GERMAN, J. A. Isolation and characterization of a β -tubulin gene from *Candida albicans*. **Gene**, v. 63, n. 1, p. 53–63, mar. 1988.
- SMITH, D.; RYAN, M. J.; DAY, J. G. **The UK National Culture Collection (UKNCC), biological resource: properties, maintenance and management**. 2001.
- SMITH, D. Culture Collections over the World. **International microbiology: the official journal of the spanish society for microbiology**, v. 6, n. 2, p. 95–100, jun. 2003.
- STEWART, G. G. Yeast culture collections, strain maintenance and propagation. in: STEWART, G. G. (Ed.). **Brewing and Distilling Yeasts**. Cham: Springer International Publishing, p. 49–54, 2017.
- ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL, R. Identifying filamentous fungi. In: A clinical laboratory handbook. **California: Star Publishing Company**, 1996.
- SU, S. C.; GARBERS, S.; RIEPER, T. D.; TONIOLO, P. Temperature Variations in Upright Mechanical Freezers. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 5, n. 2, p. 139–140, fev. 1996.
- SUGIOKA, K.; NAKANO, M.A Possible mechanism of the generation of singlet molecular oxygen in nadph-dependent microsomal lipid peroxidation. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 423, n. 2, p. 203–216, fev. 1976.
- SUZUKI, R.; YIKELAMU, A.; TANAKA, R.; IGAWA, K.; YOKOZEKI, H.; YAGUCHI, T. Studies in phylogeny, development of rapid identification methods, antifungal susceptibility, and growth rates of clinical strains of *Sporothrix schenckii* complex in Japan. **Medical Mycology Journal**, v. 57, n. 3, p. 47–57, 2016.

TABORDA, C. P.; DA SILVA, M. B.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 331–339, abr. 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Centro de Coleções Taxonômicas. 2018. Disponível em: <https://www2.icb.ufmg.br/cct/>. Acesso em: 19 mar. 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. 2018. Disponível em: <https://www.ufpe.br/micoteca/sobre>. Acesso em: 19 mar. 2018.

XAVIER, M. O.; BITTENCOURT, L. R.; SILVA, C. M. da; VIEIRA, R. S.; PEREIRA, H. C. P. Atypical presentation of sporotrichosis: report of three cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 116–118, jan. 2013.

WATANABE, S.; KAWASAKI, M.; MOCHIZUKI, T.; ISHIZAKI, H. RFLP Analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi = Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 45, n. 3, p. 165–175, 2004.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular Cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, n. 5, p. 438–450, ago. 2001.

World Data Center for Microorganism. Culture Collection Information Worldwide. Statistics. 2018. Disponível em: <http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/>. Acesso em: 19 mar. 2018.

WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS. **World Federation for Culture Collections guidelines: for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms**. Japan: World Federation for Culture Collections, 2010.

YAMAGATA, J. P. M.; RUDOLPH, F. B.; NOBRE, M. C. L.; NASCIMENTO, L. V.; SAMPAIO, F. M. S.; ARINELLI, A.; FREITAS, D. F. Ocular sporotrichosis: a frequently misdiagnosed cause of granulomatous conjunctivitis in epidemic areas. **American Journal of Ophthalmology Case Reports**, v. 8, p. 35–38, dez. 2017.

YOKOYAMA, K.; KAJI, H.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. The Role of microfilaments and microtubules in apical growth and dimorphism of *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v. 136, n. 6, p. 1067–1075, jun. 1990.

YU, X.; WAN, Z.; ZHANG, Z.; LI, F.; LI, R.; LIU, X. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in northeast China. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 67–74, ago. 2013.

ZANCOP-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. New diagnostic applications in sporotrichosis. **Skin Biopsy - Perspectives**. 2011.

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B.; RODRIGUES, A. M.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, n. 1, p. 1–20, dez. 2015.

ZHANG, J.; JIN, K.; XIA, Y. Contributions of β -tubulin to cellular morphology, sporulation and virulence in the insect-fungal pathogen, *metarhizium acridum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 103, p. 16–24, jun. 2017.